

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 4 月 25 日 (25.04.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/33072 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, 15/62, [JP/JP]; 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153-2 中外製薬株式会社内 Ibaraki (JP).
C07K 16/28, A61K 39/395
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/09259 (74) 代理人: 高木千嘉, 外(TAKAGI, Chiyoshi et al.); 〒102-0083 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2001 年 10 月 22 日 (22.10.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) 優先権データ:
特願 2000-321821 2000 年 10 月 20 日 (20.10.2000) JP
PCT/JP01/03288 2001 年 4 月 17 日 (17.04.2001) JP
特願 2001-277314 2001 年 9 月 12 日 (12.09.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 土屋政幸 (TSUCHIYA, Masayuki) [JP/JP]. 大友俊彦 (OHTOMO, Toshihiko) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 蒔田尚弘 (YABUTA, Naohiro) [JP/JP]. 角田浩行 (TSUNODA, Hiroyuki) [JP/JP]. 織田哲郎 (ORITA, Tetsuro)
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DEGRADED TPO AGONIST ANTIBODY

(54) 発明の名称: 低分子化 TPO アゴニスト抗体

(57) Abstract: A modified antibody containing at least two H chain V domains and at least two L chain V domains of a monoclonal antibody which transduces a signal into cells by crosslinking a TPO receptor to thereby exert TPO agonism. Because of being usable as a TPO signal transduction agonist, this modified antibody is useful as a preventive and/or a remedy for blood diseases in which platelet reduction participates, thrombopenia following chemotherapy for cancer or leukemia, etc.

(57) 要約:

本発明は、TPO レセプターを架橋することにより細胞内にシグナル伝達して TPO アゴニスト作用を奏しうる、モノクローナル抗体の H 鎖 V 領域を 2 つ以上及び L 鎖 V 領域を 2 つ以上含む改変抗体に関する。この改変抗体は、TPO によるシグナル伝達のアゴニストとして使用することができ、血小板減少が関与する血液疾患、癌や白血病等の化学治療後の血小板減少症などの予防及び／又は治療薬等として有用である

WO 02/33072 A1

明 細 書

低分子化TPOアゴニスト抗体

技術分野

- 5 本発明は、TPOレセプターを架橋することによりTPOアゴニスト作用を示す、抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む改変抗体に関する。当該改変抗体は、TPOレセプターを架橋することにより細胞内にシグナルを伝達しうるTPOアゴニスト作用を有しており、種々の医薬として有用である。

10 背景技術

- トロンボポエチン（TPO）は、1994年に発見された血小板産生調節因子であり、主に肝臓で産生される分子量7万～8万の糖タンパク質からなることが知られている。トロンボポエチンは、骨髄において血小板前駆体細胞の生存、増殖、分化および成熟、即ち巨核球の分化および増殖を促進するサイトカインである。
- 15 一方、トロンボポエチン（TPO）レセプターは、血小板産生を調節する特異的因子の受容体c-MplとしてTPOより先に同定されていた（M. Souyri et al., Cell 63: 1137 (1990)）。c-Mplは、血小板前駆細胞、巨核球及び血小板に局在し、c-Mplの発現の抑制が巨核球形成を選択的に阻害することが報告された（M. Methia et al., Blood 82: 1395 (1993)）。そして、c-Mplに
- 20 対するリガンドは、c-Mplリガンド特異的細胞の増殖アッセイ及び精製手段としてのc-Mplを用いたそのリガンドの精製からTPOであることが報告され（F. de Sauvage et al., Nature 369: 533 (1994); TD. Bartley et al., Cell 77:1117 (1994)）、現在、MplはTPOレセプターと称されている。このため、TPOおよびTPOレセプターのアゴニストは、種々の血小板減少症の治療薬として、例えば癌患者に対する骨髄抑制及び脊髄切断療法に付随する血小板減少症を緩和する医薬としての応用が期待されている。
- 25 一方、改変抗体、特に低分子化抗体、例えば一本鎖Fvは、その低分子化により組織、腫瘍等への移行性を改善し、遺伝子工学的に調製する目的で開発された

ものであるが、近年、一本鎖F_vのダイマー、特に、二重特異性 [bispecific] のダイマーが細胞同士の架橋を目的として使用されている。このようなダイマーとしては、代表的には癌細胞抗原とNK細胞や好中球など宿主細胞抗原を認識する一本鎖F_vのヘテロダイマー等が知られている (Kipriyanov et al., Int. J. Cancer, 77, 9763-9772, 1998)。これらは、細胞間架橋を誘導させることにより癌を治療するためのより効率的な改変抗体として、一本鎖F_vの構築技術から作成されたものである。このため、抗体およびその断片（例えばF_ab断片など）および二重特異性の改変抗体、さらには単一特異性である一本鎖F_vのダイマーでも細胞間の架橋が誘導されると考えられていた。

また、細胞表面分子を架橋してシグナルを伝達しうるモノクローナル抗体として、例えば細胞の分化・増殖に関与するEPO受容体に対する抗体（特開2000-95800号公報）、MuSK受容体に対する抗体 (Xie et al., Nature Biotech. 15, 768-771, 1997) などが知られている。また、TOPレセプターに対するアゴニスト抗体、その断片および一本鎖F_vなども知られている

(W099/17364)。しかし、アゴニスト作用を有する一本鎖F_vのダイマーおよび一本鎖2価抗体等の改変抗体については報告はない。

そこで、先ず本発明者らは、IAPを有する細胞に対してアポトーシスを誘起するモノクローナル抗体 (MABL-1およびMABL-2抗体) を取得し、それをもとに作製した一本鎖F_vのモノマーは細胞にアポトーシスを誘起せず、ダイマーが細胞に対してアポトーシスを誘導することに注目し、これらが細胞表面上のIAP受容体を架橋（2量体化）することにより当該細胞にシグナルが伝達されて、その結果アポトーシスが誘導されたことを突き止めた。即ち、これは、単一特異性の一本鎖F_vダイマーが細胞表面上の分子（例えば受容体）を架橋することにより、リガンドと同様にシグナルを伝達し、これによりアゴニスト作用を示しうることを示唆するものである。

次に細胞間の架橋形成に注目したところ、前記モノクローナル抗体は赤血球凝集を引き起こすが、前記一本鎖F_vのダイマーは赤血球凝集を起こさないことを見出した。同様の結果は、一本鎖2価抗体（2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V

領域を含む一本鎖ポリペプチド)でも観察された。即ち、これはモノクローナル抗体では細胞間で架橋が形成される可能性があるのに対して、一本鎖F_vダイマーまたは一本鎖2価抗体等の改変抗体では、細胞表面上の分子を架橋するが、細胞間の架橋を形成しないことを示唆するものである。

5 本発明者は、これらの結果から、一本鎖F_vダイマーや一本鎖2価抗体等の改変抗体が、従来知られていた細胞間の架橋だけでなく、同じ細胞の細胞表面分子あるいは細胞内分子を架橋する、当該分子に対するリガンド（特に天然のリガンドの作用を模倣するようリガンド）として特に適していることを初めて見出した。

10 さらに、本発明者は、抗体分子（w h o l e I g G）を一本鎖F_vダイマーまたは一本鎖2価抗体などの改変抗体にすることにより、細胞間の架橋などによる副作用を軽減し、且つ細胞表面上の分子を架橋して、細胞に所望の作用のみを誘起しうる新規な医薬品を提供しうることを見出し、本発明を完成させた。また、
15 本発明の改変抗体は、当該改変抗体と同じV領域を有するw h o l eの抗体（I g G）と比較して顕著に高い活性を有しており、さらに抗体分子に比べ分子量が小さく、定常領域を有しないという特徴から、組織移行性が向上しているという特徴を有している。

発明の開示

20 本発明の課題は、TPOレセプターを架橋することによりTPOアゴニスト作用を示す、抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む低分子化アゴニスト改変抗体を提供することである。

従って、本発明は、TPOレセプターを架橋することによりTPOアゴニスト作用を示す、抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上、好ましくは各々2～6、さらに好ましくは各々2～4、特に好ましくは各々2つ含む改変抗体に関する。
25

本明細書において「改変抗体」とは、抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含み、これら各V領域を直接的あるいはリンカー等を介して共有

結合および／または非共有結合により結合した任意の物質を意味する。具体的には、抗体の各V領域をペプチドリンカー、化学架橋剤等のリンカーで結合したポリペプチドまたは化合物等があげられる。なお、本発明の改変抗体において、抗体由来の2つ以上のH鎖V領域及びL鎖V領域は各々、同一または異なる抗体由来のH鎖V領域及びL鎖V領域であってもよい。

本発明の改変抗体は、TPOレセプターを特異的に認識して当該レセプターを架橋し、これにより細胞内にシグナルを伝達しうるものであればいかなるものでもよく、さらには、該改変抗体のV領域のアミノ酸配列の一部を改変した改変抗体も包含される。

本発明の改変抗体は、好ましくは1つのH鎖V領域及び1つのL鎖V領域を含む一本鎖F_vのダイマー、トリマー、テトラマー等のマルチマーであるか、又は2つ以上のH鎖V領域及び2つ以上のL鎖V領域を含む一本鎖ポリペプチドである。本発明の改変抗体が1つのH鎖V領域及び1つのL鎖V領域を含む一本鎖F_vのダイマー、トリマー、テトラマー等のマルチマーである場合、同じ鎖上のH鎖V領域及びL鎖V領域は互いに連合して1つの抗原結合部位を形成していないものが好ましい。

特に好ましくは、1つのH鎖V領域及び1つのL鎖V領域を含む一本鎖F_vのダイマー、又は2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む一本鎖ポリペプチドである。該改変抗体中において、H鎖V領域及びL鎖V領域は、好ましくはリンカーを介して連結されている。

前記一本鎖F_vのマルチマーは、非共有結合によるマルチマー、架橋基を介した共有結合によるマルチマー、さらに前記一本鎖F_vと結合しうる架橋剤（抗体、抗体断片、又は2価の改変抗体）を介したマルチマーが包含される。マルチマーを形成させる架橋基は、ペプチドの架橋に用いられている公知の架橋基を用いることができるが、例えばシステイン残基によるジスルフィド架橋、他の架橋基、例えばC₄～C₁₀アルキレン（例えば、テトラメチレン、ペンタメチレン、ヘキサメチレン、ヘプタメチレンおよびオクタメチレンなど）またはC₄～C₁₀アルケニレン（cis/trans-3-ブテニレン、cis/trans-2-ペンテニレン、cis/

trans-3-ペンテニレンおよび cis/trans-3-ヘキセニレンなど) である。

また、一本鎖 F_v と結合しうる架橋剤は、例えば F_v 中に随意に導入しうるアミノ酸配列、例えば FLAG 配列等に対する抗体もしくはその断片、またはその抗体由来の改変抗体、例えば一本鎖 F_v である。

- 5 本明細書において「TPO アゴニスト作用」とは、TPO レセプターを架橋することにより細胞内にシグナルが伝達されて該細胞に生じる生物学的作用をいい、具体的には、巨核球の増殖、分化または成長の刺激、血小板の産生等の作用をいう。

- 10 本発明において、TPO アゴニスト作用の ED₅₀ 値は、公知の TPO アゴニスト作用の測定法より求めることができる。具体的には、BaF/mpl や UT7/TPO などの TPO 反応性細胞株を用いた細胞増殖アッセイ、MPL タンパクのリン酸化測定、骨髓細胞からの分化による巨核球コロニーアッセイ、インビボでのマウス血小板回復合成アッセイ、ヒト白血病巨核芽球細胞株 (CMK) を用いた血小板抗原 GPIIb/IIIa (抗 GPIIb/IIIa) 発現の誘導、巨核芽球細胞株 (DAMI) における倍数化の誘導等により測定することができ、その反応容量曲線の最大活性を 100% とし、反応率 50% となる用量を ED₅₀ 値とする。

- 20 本発明の改変抗体は、当該改変抗体と同一の抗原結合領域を有する抗体、即ち、当該改変抗体の抗原結合領域を形成する H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域の対と同一の H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域の対を有する IgG 等の whole の抗体 (以下、親抗体という) と比較して同等以上の TPO アゴニスト作用 (ED₅₀ 値) を示すものが好ましい。さらに、親抗体と比較して 2 倍以上、好ましくは 5 倍以上、さらに好ましくは 10 倍以上の TPO アゴニスト作用 (ED₅₀ 値) を示すものが好ましい。また、TPO レセプターには結合するが、TPO アゴニスト作用を実質的に有さない親抗体と同一の抗原結合領域を形成する H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域の対を有する改変抗体であって、当該改変抗体はアゴニスト作用を有するものも本発明に含まれる。

25 本発明の抗体の H 鎖 V 領域を 2 つ以上及び L 鎖 V 領域を 2 つ以上含む化合物とは、トロンボポエチン (TPO) と比較して同等以上の TPO アゴニスト作用 (ED₅₀ 値) を示し、抗体の H 鎖 V 領域を 2 つ以上及び L 鎖 V 領域を 2 つ以上含む

化合物であればいかなるものでもよく、TPOと比較して2倍以上、好ましくは5倍以上、さらに好ましくは10倍以上のTPOアゴニスト作用（ED50 値）を示す化合物が好ましい。

5 ここでいう「化合物」とは、本発明の改変抗体に限らず、wholeの抗体、 $F(a b')_2$ 等、2つ以上、好ましくは2～6、さらに好ましくは2～4、特に好ましくは2つの抗原結合部位を有するものであればいかなるものも含まれる。

本発明の抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む改変抗体または化合物は、親抗体と比較して、1/10以下の細胞間接着作用（ED50 値）を示すものが好ましく、細胞間接着作用を実質的に有さないものが特に好ましい。

10 ここでいう細胞間接着作用のED50 値とは、公知の細胞間接着作用の測定法、例えばTPOレセプターを発現する細胞の凝集を指標にしてより求めることができる。

本発明は上記改変抗体をコードするDNAに関する。

本発明は上記改変抗体を産生する動物細胞または微生物に関する。

15 本発明は上記改変抗体のTPOアゴニストとしての使用に関する。

本発明は上記改変抗体を用いてTPOレセプターを架橋することにより細胞内にシグナル伝達を起し、巨核球の増殖、分化誘導または成長の刺激、血小板の産生、TPOレセプタータンパク質のリン酸化等のTPOアゴニスト作用を生じさせる方法に関する。

20 本発明は、上記改変抗体を有効成分として含む血小板減少症治療剤等の医薬に関する。

本発明は、上記改変抗体の医薬としての使用に関する。

25 本発明は、TPOレセプターを架橋することによりTPOアゴニスト作用を示す、抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む改変抗体のスクリーニング方法又は測定方法であって、1) TPOレセプターに特異的に結合する、抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む改変抗体を作製し、2) TPOレセプターを発現している細胞と該改変抗体とを接触させ、3) TPOレセプターを架橋することにより該細胞に生ずるTPOアゴニスト作用を

測定する、工程を含むスクリーニング方法又は測定方法に関する。本発明の測定方法は、本発明の改変抗体を医薬品として製造する場合の品質管理に用いることができる。

5 本発明の改変抗体は、単一特異性 (mono-specific) 改変抗体でも、二重特異性 (bi-specific) 改変抗体等の多重特異性 (multi-specific) 改変抗体であってもよいが、好ましくは単一特異性 (mono-specific) 改変抗体である。

10 本発明はまた、改変抗体のH鎖V領域及び／又はL鎖V領域が、ヒト抗体由来のH鎖V領域及び／又はヒト抗体由来のL鎖V領域である改変抗体に関する。ヒト抗体由来のH鎖V領域及びL鎖V領域は、例えばWO 99/10494号公報に記載された方法のように、ヒトモノクローナル抗体のライブラリーをスクリーニングすることにより得ることができる。また、トランスジェニックマウス等から作製されたヒトモノクローナル抗体由来のH鎖V領域及びL鎖V領域も包含される。

15 さらに本発明は、改変抗体のH鎖V領域及び／又はL鎖V領域が、ヒト型化H鎖V領域及び／又はヒト型化L鎖V領域である改変抗体に関する。詳細には、ヒトモノクローナル抗体L鎖V領域のフレームワーク領域 (FR) とヒト以外の哺乳動物 (例えば、マウス、ラット、ウシ、ヒツジ、サルなど) のモノクローナル抗体のL鎖V領域の相補性決定領域 (complementarity determining region; 以下CDRとする) を含むヒト型化L鎖V領域及び／又はヒトモノクローナル抗体
20 H鎖V領域のFRとヒト以外の哺乳動物 (例えば、マウス、ラット、ウシ、ヒツジ、サルなど) モノクローナル抗体のH鎖V領域のCDRを含むヒト型化H鎖V領域から構成される。この場合、CDRおよびFRのアミノ酸配列を一部改変 (例えば、欠失、置換又は付加) してもよい。

25 本発明はまた、改変抗体のH鎖V領域及び／又はL鎖V領域が、ヒト以外の動物 (例えば、マウス、ラット、ウシ、ヒツジ、サル、ニワトリなど) のモノクローナル抗体由来のH鎖V領域及び／又はL鎖V領域も包含される。この場合、CDRおよびFRのアミノ酸配列を一部改変 (例えば、欠失、置換又は付加) してもよい。

本発明はまた、前記種々の改変抗体をコードするDNA、該DNAを含んで成る組換えベクターを製造する遺伝子工学的方法に関する。

本発明はまた、該組換えベクターにより形質転換された宿主に関する。宿主は、例えばヒト細胞、マウス細胞などの動物細胞、又は大腸菌、枯草菌、酵母などの微生物である。

本発明はまた、上記の宿主を培養し、培養物から改変抗体を採取することを特徴とする、改変抗体の製造方法に関する。

さらに本発明は、一本鎖F_vを産生する宿主動物細胞を無血清培地で培養して該培地中に一本鎖F_vを分泌させ、該培地中で形成された一本鎖F_vのダイマーを含む該培地上清を精製することを特徴とする一本鎖F_vのダイマーの製造方法に関する。

本発明はまた、改変抗体のTPOアゴニストとしての使用に関する。即ち、前記得られた改変抗体を有効成分として含有するシグナル伝達アゴニストに関する。

故に、本発明のTPOアゴニスト改変抗体を有効成分として含有する医薬製剤は、血小板減少が関与する血液疾患、癌や白血病等の化学治療後の血小板減少症などの治療及び／又は予防に有用である。

本発明の改変抗体は、抗体に由来するH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む。当該改変抗体の構成としては、好ましくは1つのH鎖V領域及び1つのL鎖V領域を含む一本鎖F_vのダイマー又は2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含むポリペプチドとすることができる。該改変抗体中において、H鎖およびL鎖のV領域は、1個以上のアミノ酸からなるペプチドリンカーを介して連結されているのが好ましい。これらの改変抗体は、モノクローナル抗体の可変領域を含有し、もとのモノクローナル抗体と同一の特異性をもって抗原に結合する。

H鎖V領域

本発明において、抗体に由来するH鎖V領域には、TPOレセプターを認識し、且つ前記分子を架橋してオリゴマー化、例えば2量体化することにより、細胞内

にシグナルを伝達しうる、抗体のH鎖V領域であって、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ヒツジ、サルなど）に由来するH鎖V領域又は前記H鎖V領域のアミノ酸配列を一部改変したH鎖V領域も本発明におけるH鎖V領域に包含されるが、ヒトモノクローナル抗体H鎖V領域のFRとマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDRを含むヒト型化H鎖V領域が好ましい。さらに、組換え技術を使用して作成し得る、ヒト由来のアミノ酸配列を有するH鎖V領域も好ましい。また、本発明のH鎖V領域には、前記H鎖V領域の断片であって、抗原結合性を保持する領域も包含される。

L鎖V領域

本発明におけるL鎖V領域には、TPOレセプターを認識し、且つ前記分子を架橋してオリゴマー化、例えば2量体化することにより、細胞内にシグナルを伝達しうる、抗体のL鎖V領域であって、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ヒツジ、サルなど）に由来するL鎖V領域又は前記L鎖V領域のアミノ酸配列を一部改変したL鎖V領域も本発明におけるL鎖V領域に包含されるが、ヒトモノクローナル抗体L鎖V領域のFRとマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDRを含むヒト型化L鎖V領域が好ましい。さらに、組換え技術を使用して作成し得る、ヒト由来のアミノ酸配列を有するL鎖V領域も好ましい。また、本発明のL鎖V領域には、前記L鎖V領域の断片であって、抗原結合性を保持する領域も包含される。

相補性決定領域（CDR）

L鎖及びH鎖の各V領域は抗原結合部位を形成し、L鎖及びH鎖上の可変領域は共通性のある比較的保存された4個のフレームワークと3個の超可変又は相補性決定領域（CDR）により連結されている（Kabat, E. A. ら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」US Dept. Health and Human Services, 1983）。

前記4個のフレームワーク領域（FR）の多くの部分はβシート構造をとり、その結果3個のCDRはループを形成し、CDRは場合によりβシート構造の一部分を形成することもある。3個のCDRはFRによって相互に立体的に非常

に近い位置に保持され、そして対をなす領域の3個のCDRと共に抗原結合部位の形成に寄与する。

これらのCDR領域は、得られた抗体のV領域のアミノ酸配列と既知抗体のV領域の既知アミノ酸配列とを照合することによって、Kabat, E. A. ら、
5 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」の経験則から見出すことができる。

一本鎖F_v

一本鎖F_vは、抗体に由来する、連結したH鎖V領域及びL鎖V領域を含むポリペプチドのモノマーであり、得られる一本鎖F_vはもとの抗体の可変領域を含有し、相補性決定領域を保存するため、もとの抗体と同一の特異性をもって抗原に結合する（特願平11-63557号）。さらに、本発明の一本鎖F_vにおいて、
10 前記可変領域および／またはCDRの一部またはそのアミノ酸配列の一部を改変（例えば、欠失、置換又は付加）することができる。本発明の一本鎖F_vを構成するH鎖V領域及びL鎖V領域は上述したものであり、H鎖V領域とL鎖V領域
15 を直接又はリンカー、好ましくはペプチドリンカーを介して連結することができ、その構成としては、[H鎖V領域]－[L鎖V領域]、[L鎖V領域]－[H鎖V領域]のいずれでもよい。本発明においては、これら一本鎖F_vはダイマー、トリマー又はテトラマーを形成させ、本発明の改変抗体とすることができる。

一本鎖改変抗体

20 本発明の2つ以上のH鎖V領域及び2つ以上のL鎖V領域、好ましくは各々2～4、特に好ましくは各々2つ含む一本鎖改変抗体は、上述のような2つ以上のH鎖V領域とL鎖V領域をそれぞれ含有する。このポリペプチドにおいて各領域は、該一本鎖改変抗体が特定の立体構造、具体的には一本鎖F_vのダイマーが構成する立体構造を模倣し得るよう配置させる必要があり、例えば

25 [H鎖V領域]－[L鎖V領域]－[H鎖V領域]－[L鎖V領域]
又は

[L鎖V領域]－[H鎖V領域]－[L鎖V領域]－[H鎖V領域]
の順序で各領域が配置され、これらの領域はリンカーを介して連結される。

リンカー

本発明において、H鎖V領域とL鎖V領域とを連結するリンカーとしては、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、又は合成化合物リンカー、例えば、Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996 に開示されるリンカーを用いることができる。これらのリンカーは同一分子内で同じ又は異なっているいてもよい。ペプチドリンカーを所望する場合、各々のリンカーの例としては：

S e r

G l y · S e r

G l y · G l y · S e r

10 S e r · G l y · G l y

G l y · G l y · G l y · S e r

S e r · G l y · G l y · G l y

G l y · G l y · G l y · G l y · S e r

S e r · G l y · G l y · G l y · G l y

15 G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · S e r

S e r · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y

G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · S e r

S e r · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y

(G l y · G l y · G l y · G l y · S e r) n

20 (S e r · G l y · G l y · G l y · G l y) n

[nは1以上の整数である]を挙げることができる。好ましいリンカーペプチドの長さは抗原となる受容体によって異なるが、一本鎖F_vにおいては通常1～20アミノ酸であるのが好ましい。2つ以上のH鎖V領域及び2つ以上のL鎖V領域を含む一本鎖改変抗体においては、[H鎖V領域]－[L鎖V領域]（又は[L鎖V領域]－[H鎖V領域]）からなる同一の抗原結合部位を形成するもの同士を連結するためのペプチドリンカーの長さは1～30アミノ酸、好ましくは1～20アミノ酸、さらに好ましくは3～18アミノ酸である。また、[H鎖V領域]－[L鎖V領域]（又は[L鎖V領域]－[H鎖V領域]）からなる同一の抗原結合

部位を形成しないもの同士を連結するためのペプチドリンカーの長さは1～40アミノ酸、好ましくは3～30アミノ酸、さらに好ましくは5～20アミノ酸である。これらのリンカーを導入する方法は本発明の改変抗体をコードするDNAの構築方法の説明において述べる。

- 5 本発明における化学合成物リンカー（化学架橋剤）は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）ジスクシンイミジルスベレート（DSS）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（BS³）、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）（DSP）、ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（DTSSP）、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシネート）（EGS）、エチレングリコールビス（スルホスクシンイミジルスクシネート）（スルホ-EGS）、ジスクシンイミジル酒石酸塩（DST）、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩（スルホ-DST）、ビス[2-（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル]スルホン（BSOCOS）、ビス[2-（スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル]スルホン（スルホ-BSOCOS）などであり、これらの架橋剤は市販されている。また、化学合成物リンカーの長さは、上述のペプチドリンカーの長さに相当する長さであるのが好ましい。
- 10
- 15

- 20 特に、一本鎖F_vのダイマーを形成させる場合、宿主細胞で産生された一本鎖モノマーを培地等の溶液中で、20%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは80%以上、最も好ましくは90%以上ダイマー化するのに適したリンカーを選択することが好ましく、具体的には2～12アミノ酸、より好ましくは3～10アミノ酸、またはこれに相当する他のリンカーが好ましい。

改変抗体の製造

- 25 改変抗体は、TPOレセプターに特異的に結合する既知または新規な抗体由来のH鎖V領域とL鎖V領域とを前述のリンカーを介して連結することにより得られる。一本鎖F_vの例として、WO 99/10494に記載される12B5抗体、12E10抗体に由来するH鎖V領域とL鎖V領域を有するものが挙げられる。2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む本発明の改変抗体の例としては、

前記モノクローナル抗体由来のH鎖V領域とL鎖V領域を有する s c 1 2 B 5 (リンカー：15アミノ酸)、s c 1 2 E 1 0 (リンカー：15アミノ酸)、d b 1 2 B 5 ダイマー (リンカー：5アミノ酸)、d b 1 2 E 1 0 ダイマー (リンカー：5アミノ酸) が挙げられる。

5 本発明の改変抗体を作製するためには、該ポリペプチドが分泌性であることを所望する場合は、そのN-末端にシグナルペプチドを付加することができる。また、該ポリペプチドの効率的精製等のために、ポリペプチド精製において有用である公知の配列、例えばF L A G配列などを挿入することができる。この場合、抗F L A G抗体を用いてダイマー形成させることもできる。

10 本発明の改変を作製するためには、これをコードするDNA、即ち一本鎖F v をコードするDNA又は再構成一本鎖ポリペプチドをコードするDNAを得る必要がある。これらのDNAは、例えばs c 1 2 B 5、d b 1 2 B 5、s c 1 2 E 1 0 及び／又はd b 1 2 E 1 0 の場合には前記F v 由来のH鎖V領域及びL鎖V領域をコードするDNAを用いて、又はこれらのDNAを鋳型とし、その配列内
15 の所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を、その両端を規定するプライマー対を用いるポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 法により増幅することにより得ることができる。

各V領域について、アミノ酸配列の一部改変を所望する場合には、P C R法を用いる公知の方法によって1又は数個のアミノ酸が改変された、即ち1もしくは
20 数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するV領域を得ることができる。特定の抗原に対して十分に活性がある改変抗体を作製するために、P C R法を用いる公知の方法によって前記V領域のアミノ酸配列の一部を改変することが望ましい。

P C Rに用いるプライマーを決定するにあたり、モノクローナル抗体から出発
25 する場合は、当該技術分野において知られた方法を用いて当該抗体由来のH鎖及びL鎖のタイピングをして両鎖の型を決定する。

次に、P C R法を用いて1 2 B 5 抗体及び1 2 E 1 0 抗体のL鎖V領域を増幅するため、5'-末端オリゴヌクレオチドプライマー及び3'-末端オリゴヌクレ

オチドプライマーを上述のように決定する。同様にして、12B5抗体及び12E10抗体のH鎖V領域の増幅のため、それぞれ5'-末端プライマー及び3'-末端プライマーを決定する。

その例として本発明においては、5'-末端プライマーはその5'-末端近傍に制限酵素HinfI切断部位を提供する配列GANTCを含有し、そして3'-末端プライマーはその5'-末端近傍に制限酵素XmaI切断部位を提供するヌクレオチド配列CCCGGGを含有するものを使用している。これらの制限酵素切断部位は可変領域をコードする目的のDNA断片をクローニングベクターにサブクローニングするために用いられる限り、他の制限酵素切断部位でもよい。

特に設計されたPCRプライマーを用いて、12B5抗体、12E10抗体の各V領域をコードするcDNAをそれらの5'-及び3'-末端において適当な塩基配列を導入して、それらが発現ベクターに容易に挿入されるように、且つそれらが該発現ベクター中で適切に機能するようにした（例えば、本発明ではKozak配列の導入により翻訳効率を上げるように工夫されている）。次に、これらのプライマーを用いてPCRにより増幅して得た12B5抗体、12E10抗体の各V領域を、所望のヒトC領域をすでに含有するHEF発現ベクター（WO92-19759参照）に挿入した。クローン化されたDNAの配列決定は任意の常法、例えば、自動DNAシーケンサー（Applied Biosystems 社製）を用いて行うことができる。

本発明の改変抗体において、リンカー、例えばペプチドリンカーは次のように導入することができる。即ち、上述のH鎖V領域及びL鎖V領域のためのプライマーと一部相補的な配列を有し、且つ該リンカーのN-末端またはC-末端をコードするようにプライマーを設計し、これを用いてPCRを行うことによって所望のアミノ酸配列および長さを有するペプチドリンカーをコードするDNAを作成することができる。そして、該DNAを介してH鎖V領域及びL鎖V領域をコードするDNAを連結すれば、所望のペプチドリンカーを有する本発明の改変抗体をコードするDNAを得ることができる。さらに、1つの改変抗体をコードするDNAを得ることができれば、前記DNAを鋳型にして、そして種々のリンカ

一用のプライマーを設計し、これを用いてPCRを実施すれば、所望のペプチドリンカーを有する改変抗体又はリンカーを有さない改変抗体をコードするDNAは容易に得ることができる。

5 また、本発明における改変抗体の各鎖V領域は、従来の技術（例えば、Sato, K. ら、Cancer Res., 53, 1-6 (1993)を参照のこと）を用いることによって、ヒト型化することが可能であり、また一旦ヒト型化された各鎖V領域をコードするDNAが作製されれば、ヒト型化一本鎖F_v、ヒト型化一本鎖F_v断片、ヒト型化モノクローナル抗体あるいはヒト型化モノクローナル抗体断片は、常法に従って容易に作出する事が可能である。さらに、必要な場合、これらのV領域のアミノ酸
10 配列の一部を改変することも可能である。

さらに、遺伝子工学における慣用技術を用いて上述のマウス由来のH鎖V領域及びL鎖V領域をコードするDNAと同様に、これらに相当する他の哺乳動物由来のDNA、例えばヒト抗体由来の各鎖V領域をコードするDNAを得ることができる。得られたDNAを用いて、他の哺乳動物、特にヒト抗体由来のH鎖V領域及びL鎖V領域、ヒト由来の一本鎖F_v及びその断片、並びにヒト由来のモノ
15 クローナル抗体及びその断片を得ることができる。

本発明の改変抗体が、二重特異性 (bi-specific) 改変抗体である場合、公知の方法（例えば、W09413804 号公報に記載の方法）により作製することができる。

20 以上のように、目的とする改変抗体の各鎖V領域、ヒト型化改変抗体の各鎖V領域をコードするDNAが作製されれば、それらを含む発現ベクター、及び該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができる。また、常法に従って宿主を培養し、産生した再構成一本鎖F_v、再構成ヒト型化一本鎖F_v、ヒト型化モノクローナル抗体及びヒト型化モノクローナル抗体断片は、細胞内又は細胞外から分離し均一にまで精製することができる。この場合、通常
25 の蛋白質で用いられる分離・精製方法、例えば各種クロマトグラフィー、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組合せて、本発明の改変抗体を分離・精製することができるが、これらに限定されるものではない。

再構成一本鎖F_vを動物細胞、例えば、COS 7 細胞、CHO細胞などの動物

培養細胞、好ましくはCHO細胞で産生する場合、無血清培地で該再構成一本鎖F_vを産生させると、培地中で形成した該一本鎖F_vのダイマーを安定的に高収率で回収・精製することができる。さらに、このようにして精製された該ダイマーは、長期間、安定してダイマーの状態で保存することができる。この場合に用い
5 ることができる無血清培地は、通常組み換えタンパク質の産生に用いられている培地であればいかなるものでもよく、特に限定されるものではない。

本発明の改変抗体の製造のために任意の発現系、例えば真核細胞、例えば動物細胞、例えば樹立された哺乳類細胞系、真糸状菌細胞、及び酵母細胞、並びに原核細胞、例えば細菌細胞、例えば大腸菌細胞等を使用することができる。好まし
10 くは、本発明の改変抗体は哺乳類細胞、例えばCOS7細胞又はCHO細胞中で発現される。

これらの場合、哺乳類細胞での発現のために有用な常用のプロモーターを用いることができる。例えば、ヒト・サイトメガロウイルス (Human cytomegalovirus: HCMV) 前期 (immediate early) プロモーターを使用するのが好まし
15 い。HCMVプロモーターを含有する発現ベクターの例には、HCMV-VH-HCY1、HCMV-VL-HCK等であって、PSV2neoに由来するプラスミドベクター (国際公開公報WO92/19759参照) が包含される。

また、その他に、本発明のために用いることのできる哺乳動物細胞における遺伝子発現のプロモーターとしてはレトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノ
20 ウイルス、シミアンウイルス40 (SV40) などのウイルスプロモーターやヒト・ポリペプチドチェーン・エロンゲーション・ファクター1 α (HEF-1 α) などの哺乳動物細胞由来のプロモーターを用いればよい。例えばSV40のプロモーターを使用する場合は、Mulligan, R. C.らの方法 (Nature, 277, 108-114, (1979))、また、HEF-1 α プロモーターを使用する場合は、Mizushima, S.らの方法 (Nucleic Acids Research, 18, 5322, (1990)) に従えば容易に実施する
25 ことができる。

複製起原 (ori) としては、SV40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、牛パピローマウイルス (BPV) 等の由来のoriを用いることができ、さ

らに発現ベクターは選択マーカーとして、ホストトランスフェラーゼAPH (3') IIあるいはI (neo) 遺伝子、チミジンキナーゼ(TK) 遺伝子、大腸菌キサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR) 遺伝子等を含むことができる。

5 上述のように作成した改変抗体の抗原結合活性は、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素標識固相免疫測定法(ELISA) または表面プラズモン共鳴等の既知の方法で測定することができる。また、元のモノクローナル抗体の結合阻害能を指標にして、具体的には該モノクローナル抗体のその抗原への濃度依存的阻害作用の有無を指標にして評価することができる。

10 詳細には、本発明の改変抗体をコードするDNAを包含する発現ベクターで形質転換した動物細胞、例えばCOS7細胞又はCHO細胞を培養し、前記培養した細胞及び／又はその培養上清、又はこれらから精製した改変抗体を用いて抗原への結合を測定する。対照として発現ベクターのみで形質転換した細胞の培養上清などを用いる。抗原、例えば12B5抗体、12E10抗体の場合にはヒトMPLを強制発現させたBa/F3細胞に、本発明の改変抗体などの試験試料又は対照の培養上清を加え、例えばフローサイトメトリーを実施して抗原結合活性を評価する。

in vitro でのシグナル伝達誘起作用(例えば、巨核球の増殖、分化誘導または成長の刺激、血小板の産生、TPOレセプタータンパク質のリン酸化等)は、抗原を発現する細胞又は該抗原遺伝子を導入した細胞に、前述の改変抗体の試験試料を添加し、当該細胞においてシグナル伝達による変化(例えば、ヒトMPL抗原特異的な増殖、タンパク質のリン酸化の測定、または血小板特異的な抗原の発現等)を既知の測定方法で評価することができる。

25 In Vivo での評価試験は例えばマウスにMPLを認識するモノクローナル抗体、本発明の改変抗体、対照としてPBS等を投与する。そして、マウス血清中の血小板量の変化で活性の強さを評価する。

上述のように、TPOレセプターに特異的に結合する、H鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む改変抗体を作製し、例えば上記のIn vitro または

In vivo での評価試験により本発明の改変抗体をスクリーニングすることによって、本発明の改変抗体を取得することができる。

本発明の改変抗体は、2つ以上のH鎖V領域及び2つ以上のL鎖V領域、好ましくは各々2～4、特に好ましくは各々2つ含むものであり、1つのH鎖V領域及び1つのL鎖V領域を含む一本鎖F_vのダイマー、又は2つ以上のH鎖V領域及び2つ以上のL鎖V領域を連結した一本鎖ポリペプチドである。このような構成をとることで、もとのモノクローナル抗体の抗原結合部位の立体構造を模倣して、優れた抗原結合性を保持するものと考えられる。

本発明の改変抗体は、親抗体分子（例えばIgG）と比較して顕著な低分子化が達成されているため、組織、腫瘍への移行性に優れており、さらに親抗体分子よりも高い活性を有する。このため、本発明の改変抗体を用いることにより、TPOのシグナルを細胞内に効率よく伝達することができる。故に、これを含有する医薬製剤は、血小板減少が関与する血液疾患、癌や白血病等の化学治療後の血小板減少症などの治療薬としての利用が期待される。また、RI標識による造影剤としての利用も期待され、RI化合物やトキシン等の他の化合物と結合させることにより、効力を増強させることも可能である。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を下記の実施例により具体的に説明するが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

本発明の改変抗体の製造方法を、下記の本鎖F_vの作製を例にして説明する。本発明の改変抗体の製造方法において用いる、ヒトIAPに対するマウスMABL-1、MABL-2抗体を産生するハイブリドーマ、MABL-1及びMABL-2は、公的微生物寄託機関である通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東一丁目1番3号）に、1997年9月11日に、受託番号それぞれFERM BP-6100、FERM BP-6101として国際寄託されている。

実施例

実施例1 (ヒトIAPに対するマウスモノクローナル抗体のV領域をコードするDNAのクローン化)

ヒトIAPに対するマウスモノクローナル抗体MABL-1及びMABL-2の可変領域をコードするDNAを次のようにしてクローン化した。

5 1. 1 メッセンジャーRNA (mRNA) の調製

ハイブリドーマMABL-1及びMABL-2からのmRNAを、mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech 社製) を用いて調製した。

1. 2 二本鎖cDNAの合成

10 約1 μ gのmRNAより Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH 社製) を用いて二本鎖cDNAを合成し、アダプターを連結した。

1. 3 抗体可変領域をコードする遺伝子のPCR法による増幅

Thermal Cycler (PERKIN ELMER 社製) を用いてPCR法を行った。

(1) MABL-1 L鎖V領域をコードする遺伝子の増幅

15 PCR法に使用するプライマーは、アダプターの部分配列とハイブリダイズする配列番号：1に示すアダプタープライマー1 (CLONTECH 社製)、及びマウスカッパ型L鎖C領域配列とハイブリダイズする配列番号：2に示すMKC (Mouse Kappa Constant) プライマー (Bio/Technology, 9, 88-89, 1991) を用いた。

20 PCR溶液50 μ lは、5 μ lの10 \times PCR Buffer II、2mM MgCl₂、0.16mM dNTPs (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、2.5ユニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq Gold (以上 PERKIN ELMER 社製)、0.2 μ Mの配列番号：1に示すアダプタープライマーと0.2 μ Mの配列番号：2に示すMKCプライマー及びMABL-1由来の二本鎖cDNA 0.1 μ gを含有し、94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて9分間そして次に94 $^{\circ}$ Cにて1分間、60 $^{\circ}$ Cにて1分間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分20秒間、この順序で加熱した。この温度サイクルを35回反復した後、反応混合物を更に72 $^{\circ}$ Cで10分間加熱した。

(2) MABL-1 H鎖V領域をコードするcDNAの増幅

PCRのためのプライマーとして配列番号：1に示すアダプタープライマー1、及び配列番号：3に示すMHC- γ 1 (Mouse Heavy Constant) プライマー

(Bio/Technology, 9, 88-89, 1991) を用いた。

c DNAの増幅は、0.2 μ MのMK Cプライマーの代わりに0.2 μ MのMHC- γ 1プライマーを用いて増幅した点を除いて、前記1. 3 (1)においてL鎖V領域遺伝子の増幅について記載したのと同じ方法により行った。

5 (3) MABL-2 L鎖V領域をコードするc DNAの増幅

PCRのためのプライマーとして配列番号：1に示すアダプタープライマー1、及び配列番号：2に示すMK Cプライマーを用いた。

c DNAの増幅は、MABL-1由来の二本鎖c DNA 0.1 μ gの代わりにMABL-2由来の二本鎖c DNA 0.1 μ gを用いて増幅した点を除いて、前記1. 3 (1)においてMABL-1 L鎖V領域遺伝子の増幅について記載したのと同じ方法により行った。

10 (4) MABL-2 H鎖V領域をコードするc DNAの増幅

PCRのためのプライマーとして配列番号：1に示すアダプタープライマー1、及び配列番号：4に示すMHC- γ 2 aプライマー (Bio/Technology, 9, 88-89, 1991) を用いた。

c DNAの増幅は、0.2 μ MのMK Cプライマーの代わりに0.2 μ MのMHC- γ 2 aプライマーを用いて増幅した点を除いて、前記1. 3 (3)においてL鎖V領域遺伝子の増幅について記載したのと同じ方法により行った。

15 1. 4 PCR生成物の精製

20 前記のようにしてPCR法により増幅したDNA断片をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製し、1 mM EDTAを含有する10 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶解した。

1. 5 連結及び形質転換

25 上記のようにして調製したMABL-1由来マウスカップ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含んで成るDNA断片約140 ngをpGEM-T Easyベクター (Promega 社製) 50 ngと、30 mM Tris-HCl (pH 7.8)、10 mM MgCl₂、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP及び3ユニット T4 DNAリガーゼ (Promega 社製) を含有する反応混合液中で、1

5℃にて3時間反応させ連結した。

次に、1 μ l の上記連結混合液を大腸菌DH5 α のコンピテント細胞（東洋紡社製）50 μ lに加え、そしてこの細胞を氷上で30分間、42℃にて1分間そして再び氷上で2分間静置した。次いで100 μ lのSOC培地（GIBCO BRL社製）を加え、100 μ g/mlのアンプシリン（SIGMA社製）を含有するLB

（Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）寒天培地上にこの大腸菌を塗布し、37℃にて終夜培養して大腸菌形質転換体を得た。

この形質転換体を、50 μ g/mlのアンプシリンを含有するLB培地3ml中で37℃にて終夜培養し、そしてこの培養物からQIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN社製）を用いてプラスミドDNAを調製した。

こうして得られた、ハイブリドーマMABL-1に由来するマウスカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをpGEM-M1Lと命名した。

上記の同じ方法に従って、ハイブリドーマMABL-1に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドを精製DNA断片から作製し、pGEM-M1Hと命名した。

また、ハイブリドーマMABL-2に由来するマウスカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドを精製DNA断片から作製し、pGEM-M2Lと命名した。

また、ハイブリドーマMABL-2に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドを精製DNA断片から作製し、pGEM-M2Hと命名した。

実施例2 （DNAの塩基配列の決定）

前記のプラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列の決定は、自動DNAシーケンサー（Applied Biosystem社製）及びABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit（Applied Biosystem社製）を用いて、メーカー指定のプロトコールに従って行った。

プラスミド p G E M - M 1 L に含まれるマウス M A B L - 1 抗体の L 鎖 V 領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号： 5 に示す。

また、プラスミド p G E M - M 1 H に含まれるマウス M A B L - 1 抗体の H 鎖 V 領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号： 6 に示す。

5 また、プラスミド p G E M - M 2 L に含まれるマウス M A B L - 2 抗体の L 鎖 V 領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号： 7 に示す。

また、プラスミド p G E M - M 2 H に含まれるマウス M A B L - 2 抗体の H 鎖 V 領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号： 8 に示す。

実施例 3 (C D R の決定)

10 L 鎖及び H 鎖の V 領域の全般的構造は、互いに類似性を有しており、それぞれ 4 つのフレームワーク部分が 3 つの超可変領域、即ち相補性決定領域 (C D R) により連結されている。フレームワークのアミノ酸配列は、比較的良く保存されているが、一方、 C D R 領域のアミノ酸配列の変異性は極めて高い (Kabat, E. A. 15 and Human Services, 1983)。

このような事実に基づき、ヒト I A P に対するマウスモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列を K a b a t らにより作製された抗体のアミノ酸配列のデータベースにあてはめ、相同性を調べることにより C D R 領域を表 1 に示す如く決定した。

20

表 1

	プラスミド	配列番号	C D R (1)	C D R (2)	C D R (3)
	p G E M - M 1 L	5	4 3 - 5 8	7 4 - 8 0	1 1 3 - 1 2 1
	p G E M - M 1 H	6	5 0 - 5 4	6 9 - 8 5	1 1 8 - 1 2 5
25	p G E M - M 2 L	7	4 3 - 5 8	7 4 - 8 0	1 1 3 - 1 2 1
	p G E M - M 2 H	8	5 0 - 5 4	6 9 - 8 5	1 1 8 - 1 2 5

実施例 4 (クローン化 c D N A の発現の確認 (キメラ M A B L - 1 抗体及びキ

メラMAB L-2抗体の作製))

4. 1 キメラMAB L-1抗体発現ベクターの作製

キメラMAB L-1抗体を発現するベクターを作製するため、それぞれマウス MAB L-1 L鎖及びH鎖V領域をコードするcDNAクローンpGEM-M1 L及びpGEM-M1 HをPCR法により修飾した。そしてHEF発現ベクター (国際公開公報WO 92/19759参照) に導入した。

L鎖V領域のための前方プライマーMLS (配列番号: 9) 及びH鎖V領域のための前方プライマーMHS (配列番号: 10) は、各々のV領域のリーダー配列の最初をコードするDNAにハイブリダイズし且つKozakコンセンサス配列 (J. mol. Biol., 196, 947-950, 1987) 及びHind III制限酵素部位を有するように設計した。L鎖V領域のための後方プライマーMLAS (配列番号: 11) 及びH鎖V領域のための後方プライマーMHAS (配列番号: 12) は、J領域の末端をコードするDNA配列にハイブリダイズし且つスプライスドナー配列及びBamHI制限酵素部位を有するように設計した。

PCR溶液100 μ lは、10 μ lの10 \times PCR Buffer II、2mM MgCl₂、0.16mM dNTPs (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、5ユニットのDNAポリメラーゼAmpliTaq Gold、0.4 μ Mずつの各プライマー、及び8ngの鋳型DNA (pGEM-M1 L及びpGEM-M1 H) を含有し、94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて9分間そして次に94 $^{\circ}$ Cにて1分間、60 $^{\circ}$ Cにて1分間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分20秒間、この順序で加熱した。この温度サイクルを35回反復した後、反応混合物を更に72 $^{\circ}$ Cで10分間加熱した。

PCR生成物をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN社製) を用いて精製し、Hind III及びBamHIで消化し、そしてL鎖V領域については、HEF発現ベクターHEF- κ に、H鎖V領域についてはHEF発現ベクターHEF- γ にそれぞれクローニングした。DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをそれぞれHEF-M1 L、HEF-M1 Hと命名した。

4. 2 キメラMAB L-2抗体発現ベクターの作製

cDNAの修飾及びクローニングは、pGEM-M1L及びpGEM-M1Hの代わりにpGEM-M2L及びpGEM-M2Hを鋳型DNAに増幅した点を除いて、前記4. 1において記載したのと同じ方法により増幅及びクローニングを行い、DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをそれぞれHEF-M2L、HEF-M2Hと命名した。

4. 3 COS 7細胞への遺伝子導入

キメラMABL-1抗体及びキメラMABL-2抗体の一過性発現を観察するため、前記発現ベクターをCOS 7細胞において試験した。

(1) キメラMABL-1抗体の遺伝子導入

HEF-M1LとHEF-M1Hベクターを、Gene Pulser 装置 (BioRad 社製) を用いてエレクトロポレーションによりCOS 7細胞に同時形質転換した。各DNA (10 µg) と、PBS中 1×10^7 細胞/mlの0.8 mlをキュベットに加え、1.5 kV、25 µFの容量にてパルスを与えた。

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%のγグロブリンフリーウシ胎児血清を含有するDMEM培養液 (GIBCO BRL 社製) に加えた。72時間培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去して回収培養上清を得た。

(2) キメラMABL-2抗体の遺伝子導入

キメラMABL-2抗体遺伝子の導入は、HEF-M1LとHEF-M1Hベクターの代わりにHEF-M2LとHEF-M2Hベクターを用いた点を除いて、前記4. 3 (1) に記載したのと同じ方法によりCOS 7細胞に同時形質転換し、回収培養上清を得た。

4. 4 フローサイトメトリー

抗原への結合を測定するため、前記COS 7細胞培養上清を用いてフローサイトメトリーを行った。ヒトIAPを発現するマウス白血病細胞株L1210細胞 4×10^5 個に、キメラMABL-1抗体を発現させたCOS 7細胞の培養上清あるいはキメラMABL-2抗体を発現させたCOS 7細胞の培養上清あるいはコントロールとしてヒトIgG1抗体 (SIGMA 社製) を加え、氷上にてインキュベ

ーション及び洗浄の後、F I T C標識した抗ヒト I g G抗体（Cappel 社製）を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、F A C S c a n装置（BECTON DICKINSON 社製）にて蛍光強度を測定した。

その結果、キメラM A B L－1抗体及びキメラM A B L－2抗体は、ヒト I A Pを発現するL 1 2 1 0細胞に特異的に結合したことにより、これらのキメラ抗体がマウスモノクローナル抗体M A B L－1及びM A B L－2のそれぞれのV領域の正しい構造を有することが明らかとなった（図1～3）。

実施例5 （再構成M A B L－1抗体及び再構成M A B L－2抗体一本鎖F v（s c F v）領域の作製）

5. 1 再構成M A B L－1抗体一本鎖F vの作製

再構成M A B L－1抗体一本鎖F vを次の様にして作製した。再構成M A B L－1抗体H鎖V領域、リンカー領域、及び再構成M A B L－1抗体L鎖V領域をそれぞれP C R法を用いて増幅し、連結することにより、再構成M A B L－1抗体一本鎖F vを作製した。この方法を図4に模式的に示す。再構成M A B L－1抗体一本鎖F vの作製のために6個のP C Rプライマー（A～F）を使用した。プライマーA、C及びEはセンス配列を有し、プライマーB、D及びFはアンチセンス配列を有する。

H鎖V領域のための前方プライマーV H S（プライマーA、配列番号：13）は、H鎖V領域のN末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つN c o I制限酵素認識部位を有するように設計した。H鎖V領域のための後方プライマーV H A S（プライマーB、配列番号：14）は、H鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つリンカーとオーバーラップするように設計した。

リンカーのための前方プライマーL S（プライマーC、配列番号：15）は、リンカーのN末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つH鎖V領域のC末端をコードするDNAとオーバーラップするように設計した。リンカーのための後方プライマーL A S（プライマーD、配列番号：16）は、リンカーのC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つL鎖V領域のN末端をコードするDNAとオーバーラップするように設計した。

L鎖V領域のための前方プライマーVLS（プライマーE、配列番号：17）は、リンカーのC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つL鎖V領域のN末端をコードするDNAにオーバーラップするように設計した。L鎖V領域のための後方プライマーVLAS-FLAG（プライマーF、配列番号：18）は、
 5 L鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つFLAGペプチドをコードする配列（Hopp, T. P. ら、Bio/Technology, 6, 1204-1210, 1988）、2個の転写停止コドン及びEcoRI制限酵素認識部位を有するように設計した。

第一PCR段階において3つの反応A-B、C-D及びE-Fを行い、そして各PCR生成物を精製した。第一PCRから得られた3つのPCR生成物をそれ
 10 ら自体の相補性によりアッセンブルさせた。次に、プライマーA及びFを加えて、再構成MABL-1抗体一本鎖Fvをコードする全長DNAを増幅した（第二PCR）。なお、第一PCRにおいては、再構成MABL-1抗体H鎖V領域をコードするプラスミドpGEM-M1H（実施例2を参照）、Gly Gly Gly
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 15 Gly Gly Ser（配列番号：19）からなるリンカー領域をコードするDNA配列（Huston, J. S. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5879-5883, 1988）を含んで成るプラスミドpSC-DP1、及び再構成MABL-1抗体L鎖V領域をコードするプラスミドpGEM-M1L（実施例2を参照）をそれぞれ鋳型として用いた。

20 第一PCR段階の溶液50 μ lは、5 μ lの10 \times PCR Buffer II、2mM MgCl₂、0.16mM dNTPs、2.5ユニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq Gold（以上PERKIN ELMER社製）、0.4 μ Mずつの各プライマー及び5ngの各鋳型DNAを含有し、94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて9分間そして次に94 $^{\circ}$ Cにて1分間、65 $^{\circ}$ Cにて1分間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分20秒間、この順序で加熱した。
 25 この温度サイクルを35回反復した後、反応混合物を更に72 $^{\circ}$ Cで7分間加熱した。

PCR生成物A-B（371bp）、C-D（63bp）、及びE-F（384bp）をQIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN社製）を用いて精製し、第二

PCRでアッセンブルした。第二PCRにおいて、鋳型として120 ngの第一PCR生成物A-B、20 ngのPCR生成物C-D及び120 ngのPCR生成物E-F、10 μ lの10 \times PCR Buffer II、2 mM MgCl₂、0.16 mM dNTPs、5ユニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq Gold (以上 PERKIN ELMER 社製) を含有する98 μ lのPCR混合液を、94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて8分間
5 そして次に94 $^{\circ}$ Cにて2分間、65 $^{\circ}$ Cにて2分間及び72 $^{\circ}$ Cにて2分間、この順序で加熱した。この温度サイクルを2回反復した後、それぞれ0.4 μ MのプライマーA及びFを加えた。そして94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて1分間そして次に94 $^{\circ}$ Cにて1分間、65 $^{\circ}$ Cにて1分間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分20秒間、この順序で加熱し、
10 この温度サイクルを35回反復した後、反応混合物を72 $^{\circ}$ Cにて7分間加熱した。

第二PCRにより生じた843 bpのDNA断片を精製し、NcoI及びEcoRIで消化し、得られたDNA断片をpSCFVT7ベクターにクローニングした。なお、本発現ベクターpSCFVT7は、大腸菌ペリプラズム分泌発現系に適するpelBシグナル配列 (Lei, S. P. ら、J. Bacteriology, 169, 4379-4383, 1987) を含んでいる。DNA配列決定の後、再構成MABL-1抗体一本鎖Fvの正しいアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドをpscM1と命名した (図5を参照)。本プラスミドpscM1に含まれる再構成MABL-1抗体一本鎖Fvの塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号: 20に示す。

次に、哺乳動物細胞にて再構成MABL-1抗体一本鎖Fvを発現するベクターを作製するため、pscM1ベクターをPCR法により修飾した。そして得られたDNA断片をpCHO1発現ベクターに導入した。なお、本発現ベクターpCHO1は、DHFR- \square E-rvH-PM1-f (WO92/19759参照) から、EcoRI及びSmaI消化により抗体遺伝子を削除し、EcoRI-NotI-BamHI Adaptor (宝酒造社製) を連結することにより
25 構築したベクターである。

PCRに使用するプライマーは、前方プライマーとしてH鎖V領域のN末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つSalI制限酵素認識部位を有する配列番号: 21に示すSal-VHSプライマー及び後方プライマーとして第一フ

レームワーク配列の最後をコードするDNAにハイブリダイズする配列番号：22に示すFRH1 a n t i プライマーを用いた。

PCR溶液100 μ lは、10 μ lの10 \times PCR Buffer II、2mM MgCl₂、0.16mM dNTPs、5ユニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq Gold、
5 0.4 μ Mずつの各プライマー、及び8ngの鋳型DNA (pscM1) を含有し、
95 $^{\circ}$ Cの初期温度にて9分間そして次に95 $^{\circ}$ Cにて1分間、60 $^{\circ}$ Cにて1分間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分20秒間、この順序で加熱した。この温度サイクルを35回反復した後、反応混合物を更に72 $^{\circ}$ Cで7分間加熱した。

PCR生成物をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製
10 し、SalI及びMboIIで消化し、N末端側再構成MABL-1抗体一本鎖FvをコードするDNA断片を得た。また、pscM1ベクターをMboII及びEcoRIで消化し、C末端側再構成MABL-1抗体一本鎖FvをコードするDNA断片を得た。そして、SalI-MboII DNA断片及びMboII-EcoRI DNA断片をpCHO1-Igsベクターにクローニングした。DNA
15 NA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをpCHOM1と命名した (図6を参照)。なお、本発現ベクターpCHO1-Igsは、哺乳動物細胞分泌発現系に適するマウスIgG1シグナル配列 (Nature, 332, 323-327, 1988) を含んでいる。本プラスミドpCHOM1に含まれる再構成MABL-1抗体一本鎖Fvの塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：23に示す。

20 5. 2 再構成MABL-2抗体一本鎖Fvの作製

再構成MABL-2抗体一本鎖Fvを前記5. 1に従って作製した。第一PCRにおいては、pGEM-M1Hの代わりに再構成MABL-2抗体H鎖V領域をコードするプラスミドpGEM-M2H (実施例2を参照)、及びpGEM-M1Lの代わりに再構成MABL-2抗体L鎖V領域をコードするプラスミドpGEM-M2L (実施例2を参照) を使用し、再構成MABL-2抗体一本鎖Fv
25 の正しいアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドpscM2を得た。本プラスミドpscM2に含まれる再構成MABL-2抗体一本鎖Fvの塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：24に示す。

また、p s c M2ベクターの修飾により再構成MAB L-2抗体一本鎖F_vの正しいアミノ酸配列をコードするDNA断片を含む哺乳動物細胞発現用p CHOM2ベクターを得た。本プラスミドp CHOM2に含まれる再構成MAB L-2抗体一本鎖F_vの塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：25に示す。

5 5.3 COS7細胞への遺伝子導入

再構成MAB L-2抗体一本鎖F_vの一過性発現を観察するため、p CHOM2ベクターをCOS7細胞において試験した。

p CHOM2ベクターを、Gene Pulser 装置 (BioRad 社製) を用いてエレクトロポレーションによりCOS7細胞に形質転換した。DNA (10 μ g) と、PBS中1 \times 10⁷細胞/mlの0.8mlをキュベットに加え、1.5kV、25 μ Fの容量にてパルスを与えた。

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%のウシ胎児血清を含有するIMDM培養液 (GIBCO BRL 社製) に加えた。72時間培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去して回収培養上清を得た。

5.4 COS7細胞培養上清中の再構成MAB L-2抗体一本鎖F_vの検出

p CHOM2ベクターを遺伝子導入したCOS7細胞培養上清中における再構成MAB L-2抗体一本鎖F_vをウェスタンブロッティング法により確認した。

p CHOM2ベクターを遺伝子導入したCOS7細胞培養上清及びコントロールとしてp CHO1ベクターを遺伝子導入したCOS7細胞培養上清についてSDS電気泳動を行い、REINFORCED NC膜 (Schleicher & Schuell 社製) に転写した。5%スキムミルク (森永乳業社製) にてブロッキングを行い、0.05%Tween 20-PBSにて洗浄後、抗FLAG抗体 (SIGMA 社製) を加えた。室温にてインキュベーション及び洗浄の後、アルカリフォスファターゼ結合抗マウスIgG抗体 (Zymed 社製) を加え、室温にてインキュベーション及び洗浄後、基質溶液 (Kirkegaard Perry Laboratories 社製) を添加し、発色させた (図7)。

その結果、p CHOM2ベクター導入COS7細胞培養上清中にのみFLAG

ペプチド特異的なタンパク質が検出され、この培養上清中に再構成MAB L-2抗体一本鎖F_vが分泌されていることが明らかとなった。

5. 5 フローサイトメトリー

5 抗原への結合を測定するため、前記COS 7細胞培養上清を用いてフローサイトメトリーを行った。ヒト Integrin Associated Protein (IAP) を発現するマウス白血病細胞株L 1 2 1 0細胞、あるいはコントロールとしてpCOS 1ベクターを形質転換したL 1 2 1 0細胞 2×10^5 個に、再構成MAB L-2抗体一本鎖F_vを発現させたCOS 7細胞の培養上清あるいはコントロールとしてpCHO 1ベクターを形質転換したCOS 7細胞の培養上清を加え、氷上にてインキュベーション及び洗浄の後、マウス抗FLAG抗体 (SIGMA 社製) を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、FITC標識した抗マウスIgG抗体 (BECTON DICKINSON 社製) を加えた。再度インキュベーション及び洗浄の後、FACS装置 (BECTON DICKINSON 社製) にて蛍光強度を測定した。

15 その結果、再構成MAB L-2抗体一本鎖F_vは、ヒトIAPを発現するL 1 2 1 0細胞に特異的に結合したことにより、この再構成MAB L-2抗体一本鎖F_vがヒト Integrin Associated Protein に対するアフィニティーを有することが明らかとなった (図8~11)。

5. 6 Competitive ELISA

20 マウスモノクローナル抗体の抗原結合に対する阻害活性を指標に、再構成MAB L-2抗体一本鎖F_vの抗原結合活性を測定した。

25 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ に調整した抗FLAG抗体を96ウェルプレートの各ウェルに加え、 37°C にて2時間インキュベートした。洗浄後、1%BSA-PBSにてブロッキングを行った。室温にてインキュベート及び洗浄後、分泌型ヒトIAP抗原遺伝子 (配列番号: 26) を導入したCOS 7細胞培養上清をPBSにて2倍希釈したものを各ウェルに加えた。室温にてインキュベート及び洗浄後、 $100 \text{ ng}/\text{ml}$ に調整したビオチン化MAB L-2抗体 $50 \mu\text{l}$ 及び順次希釈した再構成MAB L-2抗体一本鎖F_v発現COS 7細胞培養上清 $50 \mu\text{l}$ を混和したものを各ウェルに加えた。室温にてインキュベート及び洗浄後、アルカリフォスファター

ゼ結合ストレプトアビジン (Zymed 社製) を加えた。室温にてインキュベート及び洗浄後、基質溶液 (SIGMA 社製) を加え、次に 405 nm での吸光度を測定した。

その結果、再構成 MABL-2 抗体一本鎖 F_v (MABL2-scF_v) は、
5 コントロールの pCHO1 導入 COS7 細胞培養上清に比較して明らかに濃度依存的にマウス MABL-2 抗体のヒト IAP 抗原への結合を阻害した (図 12)。このことから、再構成 MABL-2 抗体一本鎖 F_v は、マウスモノクローナル抗体 MABL-2 のそれぞれの V 領域の正しい構造を有することが示唆された。

5. 7 in vitro でのアポトーシス誘起効果

10 ヒト IAP を遺伝子導入した L1210 細胞、及びコントロールとして pCOS1 ベクターを遺伝子導入した L1210 細胞、及び CCRF-CEM 細胞を用い、再構成 MABL-2 抗体一本鎖 F_v のアポトーシス誘起作用を Annexin-V (BOEHRINGER MANNHEIM 社製) 染色により検討した。

15 各細胞 1×10^5 個に、再構成 MABL-2 抗体一本鎖 F_v 発現 COS7 細胞培養上清あるいはコントロールとして pCHO1 ベクター導入 COS7 細胞培養上清を終濃度 50% で添加し、24 時間培養した。その後、Annexin-V 染色を行い、FACSca 装置 (BECTON DICKINSON 社製) にて蛍光強度を測定した。

20 Annexin-V 染色による解析の結果を図 13 ~ 18 にそれぞれ示した。ここで、図の左下の領域にあるドットは生細胞を、右下の領域はアポトーシス初期の細胞を、右上の領域はアポトーシス後期の細胞を示す。その結果、再構成 MABL-2 抗体一本鎖 F_v (MABL2-scF_v) は L1210 細胞においてヒト IAP 抗原特異的に著しい細胞死を誘導した (図 13 ~ 16)。また、CCRF-CEM 細胞においてもコントロールに比較して著しい細胞死を誘導した (図
25 17 ~ 18)。

5. 8 CHO 細胞における MABL-2 抗体由来の一本鎖 F_v ポリペプチドの発現

MABL-2 抗体由来の一本鎖 F_v (ポリペプチド) の恒常的発現 CHO 細胞

株を樹立するため、pCHOM2ベクターをCHO細胞に遺伝子導入した。

pCHOM2ベクターを、Gene Pulser 装置 (BioRad 社製) を用いてエレクトロポレーションによりCHO細胞に形質転換した。DNA (10 μ g) とPBSに懸濁したCHO細胞 (1 \times 10⁷細胞/ml) の0.7mlを混合したものをキュベットに加え、1.5kV、25 μ Fの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%のウシ胎児血清を含有する核酸不含 α -MEM培地 (GIBCO BRL 社製) に加え培養した。得られたクローンについて、SDS-PAGEにて目的とするタンパク質の発現を確認し、発現量の高いクローンをMABL-2抗体由来の一本鎖Fvの産生細胞株として選択した。10nM methotrexate (SIGMA 社製) を含む無血清培地CHO-S-SFM II (GIBCO BRL 社製) にて培養後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去して回収培養上清を得た。

5. 9 CHO細胞産生のMABL-2抗体由来の一本鎖Fvの精製

5. 8で得た一本鎖Fv発現CHO産生株の培養上清を人工透析用カートリッジ (PAN130SF、旭メディカル) を用いて約20倍まで濃縮した。濃縮液は-20℃で保存し、精製時解凍して用いた。

CHO細胞培養上清から一本鎖Fvの精製は、Blue-sepharose、ハイドロキシアパタイト及びゲル濾過の三種のクロマトグラフィーにより行った。

(1) Blue-sepharose カラムクロマトグラフィー

培養上清の濃縮液を20mM 酢酸緩衝液 (pH6.0) にて10倍希釈し、遠心分離 (10000rpm \times 30分) により不溶物を除去した。上清を同緩衝液で平衡化したBlue-sepharose カラム (20ml) に添加し、同緩衝液でカラムを洗浄後、同緩衝液中NaCl濃度を0.1、0.2、0.3、0.5及び1.0Mまで段階的に上げ、カラムに吸着した蛋白質を溶出した。SDS-PAGEで素通り及び各溶出画分を分析し、一本鎖Fvが確認された画分 (0.1~0.3M NaCl 溶出画分) をプールし、Centriprep-10 (アミコン) を用いて約20倍濃縮した。

(2) ハイドロキシアパタイト

(1) の濃縮液を10mM リン酸緩衝液 (pH7.0) にて10倍希釈し、ハ

イドロキシアパタイトカラム（20 ml、BioRad）に添加した。60 mlの10 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）でカラムを洗浄後、リン酸緩衝液濃度を200 mMまで直線的に上げ、カラムに吸着した蛋白質を溶出した（図19）。SDS-PAGEにより各画分を分析した結果、画分A及び画分Bに一本鎖F_vが確認された。

（3）ゲル濾過

（2）の画分A及びBをそれぞれCentriprep-10を用いて濃縮し、0.15 M NaClを含む20 mM 酢酸緩衝液（pH 6.0）で平衡化したTSK gel G3000 SWGカラム（21.5×600 mm）に添加した。クロマトグラムを図20に示す。得られた画分をSDS-PAGEで分析した結果、いずれも主要ピーク（A I、B I）が目的の一本鎖F_vであり、ゲル濾過で分析した結果、画分Aでは見かけ上の分子量約36 kD、画分Bでは同76 kDに溶出された。精製した一本鎖F_v（A I、B I）を15%-SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて分析した。サンプルを還元剤添加、非添加で処理し、Laemmliの方法に準じて電気泳動を行い、泳動後蛋白質をクマシーブリリアントブルー染色した。図21に示すように、A I、B Iいずれも還元剤の添加の有無に関わらず、見かけ上の分子量約35 kDに単一バンドを与えた。以上の結果から、A Iは一本鎖F_vのモノマーで、B Iは一本鎖F_vの非共有結合性ダイマーと考えられる。画分A I及びB IをTSK gel G3000 SWカラム（7.5×60 mm）を用いたゲル濾過により分析した結果、画分A Iはモノマーのピークのみ、画分B Iはダイマーのピークのみ検出された（図22を参照）。また、ダイマー画分（画分B I）は、全一本鎖F_vの約4%であった。該ダイマー画分中のダイマーは、その90%以上が4℃で1ヶ月以上安定的に維持された。

5. 10 大腸菌細胞でのMABL-2抗体由来の一本鎖F_vポリペプチド発現ベクターの構築

MABL-2抗体由来の一本鎖F_vを大腸菌菌体内にて効率的に発現するベクターを作製するため、pscM2ベクターをPCR法により修飾した。得られたDNA断片をpSCFVT7発現ベクターに導入した。

PCRに使用するプライマーは、前方プライマーとしてH鎖V領域のN末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つ開始コドン及びNdeI制限酵素認識部位を有する配列番号：27に示すNde-VHSm02プライマー及び後方プライマーとしてL鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つ2個の停止コドン及びEcoRI制限酵素認識部位を有する配列番号：28に示すVLASプライマーを用いた。なお、前方プライマーのNde-VHSm02は大腸菌菌体内にて効率的に発現するため、H鎖V領域のN末端をコードするDNAにハイブリダイズする部分に5カ所の点変異を含んでいる。

PCR溶液100 μ lは、10 μ lの10 \times PCR Buffer #1、1mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ（以上東洋紡社製）、1 μ Mずつの各プライマー、及び100ngの鋳型DNA（pscM2）を含有し、98 $^{\circ}$ Cにて15秒間、65 $^{\circ}$ Cにて2秒間及び74 $^{\circ}$ Cにて30秒間、この順序で加熱した。この温度サイクルを25回反復した。

PCR生成物をQIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN社製）を用いて精製し、NdeI及びEcoRIで消化し、得られたDNA断片をpSCFVT7ベクターにクローニングした。なお、本発現ベクターpSCFVT7はNdeI及びEcoRIで消化したことによりpelBシグナル配列が削除されている。DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをpscM2DEm02と命名した（図23を参照のこと）。本プラスミドpscM2DEm02に含まれるMABL-2抗体由来の一本鎖Fvの塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：29に示す。

5. 1.1 大腸菌細胞におけるMABL-2抗体由来の一本鎖Fvポリペプチドの発現

MABL-2抗体由来の一本鎖Fvポリペプチドを発現する大腸菌株を得るため、pscM2DEm02ベクターを大腸菌BL21（DE3）pLysS（STRATAGENE社製）に形質転換した。得られたクローンについて、SDS-PAGEにて目的とするタンパク質の発現を検討し、発現量の高いクローンをMABL-2抗体由来の一本鎖Fvポリペプチドの産生株として選択した。

5. 12 大腸菌細胞産生のMABL-2抗体由来の一本鎖Fvポリペプチドの精製

形質転換して得られた大腸菌のシングルコロニーをLB培地3mlにて28℃で7時間培養し、これを70mlのLB培地に植え継ぎ、28℃にて一夜培養を行った。このpre-cultureを7LのLB培地に植え継ぎ、ジャーファーマンターを用いて28℃、攪拌速度300rpmにて培養した。O.D.=1.5のときに1mM IPTGで誘導をかけ、その後3時間培養を行った。

培養液を遠心分離(10000×g、10分)し、沈殿として回収した菌体に5mM EDTA、0.1M NaCl、1%Triton X-100を含む50mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0)を加え、超音波(out put: 4、duty cycle: 70%、1分×10回)により菌体を破砕した。この懸濁液を遠心分離(12000×g、10分)にかけ、沈殿として回収した封入体に5mM EDTA、0.1M NaCl、4%Triton X-100を含む50mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0)を加え、再度超音波処理(out put: 4、duty cycle: 50%、30秒×2)を行い、遠心分離(12000×g、10分)により目的蛋白質を沈殿として回収し、上清にくる夾雑蛋白質を除去した。

目的蛋白質を含んだ封入体を6M Urea、5mM EDTA、0.1M NaClを含む50mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0)に溶解し、4M Urea、5mM EDTA、0.1M NaCl、10mM メルカプトエタノールを含む50mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0)で平衡化したSephacryl S-300(5×90cm、AMERSHAM PHARMACIA社製)ゲル濾過カラムに、流速5ml/分で添加し、会合している高分子量の一本鎖Fvを除去した。各画分をSDS-PAGEで分析し、純度の高い画分について、O.D.₂₈₀=0.25になるようにゲル濾過で用いた溶媒で希釈後、5mM EDTA、0.1M NaCl、0.5M Arg、2mM 還元型グルタチオン、0.2mM 酸化型グルタチオンを含む50mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0)に対して透析を3回行うことにより、巻き戻し操作を行った。さらに0.15M NaClを含む20mM 酢酸緩衝液(pH6.0)に対して3回透析し、溶媒交換を行った。

わずかに含まれる分子間でS-S結合で架橋された高分子を分離除去するため、0.15M NaClを含む20mM 酢酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したSuperdex 200 pg (2.6×60cm、AMERSHAM PHARMACIA社製)ゲル濾過カラムに添加した。図24に示すように、高分子量の会合体と考えられるブロードなピークのあと、主要ピークとサブピークの2つのピークが検出された。SDS-PAGEによる分析(図21参照)及びゲル濾過の溶出位置から、主要ピークは一本鎖Fvポリペプチドのモノマーであり、サブピークは非共有結合性のダイマーと考えられる。なお、形成された非共有結合性のダイマーは、全一本鎖Fvポリペプチドの約4%であった。

5. 13 MABL-2抗体由来の精製一本鎖Fvポリペプチドのin vitroでのアポトーシス誘起効果

ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞(hIAP/L1210)を用い、CHO細胞及び大腸菌細胞産生のMABL-2抗体由来の一本鎖Fvポリペプチド(MABL2-scFv)のアポトーシス誘起作用を、次の2つのプロトコールにてAnnexin-V(BOEHRINGER MANNHEIM社製)染色により検討した。

第一のプロトコールは、hIAP/L1210細胞 5×10^4 個に、抗体試料を終濃度 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ で添加し、24時間培養した。抗体試料として、実施例5.9で得たCHO細胞由来MABL2一本鎖Fvのモノマー及びダイマー、さらに実施例5.12で得た大腸菌細胞由来の同モノマー及びダイマー、そしてコントロールとしてマウスIgG抗体について検討した。培養後、Annexin-V染色を行い、FACSscan装置(BECTON DICKINSON社製)にて蛍光強度を測定した。

また、第二のプロトコールは、hIAP/L1210細胞 5×10^4 個に、抗体試料を終濃度 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ で添加し、2時間培養後に抗FLAG抗体(SIGMA社製)を終濃度 $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ で添加し、更に22時間培養した。抗体試料として、5.9で得たCHO細胞由来MABL2一本鎖Fvのモノマー及びコントロールとしてマウスIgG抗体について検討した。培養後、Annexin-V染色を行い、FACSscan装置にて蛍光強度を測定した。

Annexin-V染色による解析の結果を図25～31にそれぞれ示した。その結果、CHO細胞及び大腸菌細胞産生のMABL-2抗体由来一本鎖Fvポリペプチドのダイマーはコントロール（図25）と比較して著しい細胞死を誘導した（図26、27）が、CHO細胞及び大腸菌細胞産生的一本鎖Fvポリペプチドのモノマーのアポトーシス誘導作用は認められなかった（図28、29）。また、抗FLAG抗体の添加により、CHO細胞産生の本鎖Fvポリペプチドのモノマーはコントロール（図30）と比較して著しい細胞死を誘導した（図31）。

5. 14 scFv／CHOポリペプチドのモノマー及びダイマーのヒト骨髓腫マウスモデルに対する抗腫瘍効果

（1）マウス血清ヒトIgG定量法

マウス血清中における、ヒト骨髓腫細胞が産生するヒトIgG（Mタンパク質）の定量は、以下のELISAで行った。0.1%重炭酸緩衝液（pH9.6）で1 μ g/mlに希釈したヤギ抗ヒトIgG抗体（BIOSOURCE社製、Lot #7902）100 μ lを96ウェルプレート（Nunc社製）に加え、4℃で一晩インキュベーションし、抗体を固相化した。ブロッキングの後、段階希釈したマウス血清あるいは標品としてヒトIgG（Cappel社製、Lot #00915）100 μ lを添加し、室温にて2時間インキュベーションした。洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG抗体（BIOSOURCE社製、Lot #6202）100 μ lを加え、室温にて1時間インキュベーションした。洗浄後、基質溶液を加え、インキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550（BioRad社製）を用いて405nmの吸光度を測定し、標品のヒトIgGの吸光度より得られた検量線から、マウス血清中のヒトIgG（Mタンパク質）濃度を算出した。

（2）投与抗体の調製

scFv／CHOポリペプチドのモノマー及びダイマーは、投与当日、濾過滅菌したPBS（－）を用いて、それぞれ0.4mg/ml、0.25mg/mlになるように調製し、投与試料とした。

(3) ヒト骨髓腫マウスモデルの作製

ヒト骨髓腫マウスモデルは以下のように作製した。SCIDマウス（日本クレア）を用いて *in vivo* 継代したKPM2細胞（特開平7-236475号公報）を10%ウシ胎児血清（GIBCO BRL社製）を含むRPMI 1640培地

5 (GIBCO BRL社製)で 3×10^7 個/mlになるように調製した。あらかじめ前日抗シアログM1抗体（和光純薬社製、1バイアルを5mlで溶解）100 μ lを皮下投与したSCIDマウス（オス、6週齢）（日本クレア）に上記KPM2細胞懸濁液200 μ l（ 6×10^6 個/マウス）を尾静脈より注入した。

(4) 抗体投与

10 (3)で作製したヒト骨髓腫マウスモデルに対し、KPM2細胞移植後3日目より、1日2回、3日間、上記(2)で調製した投与試料、モノマーは250 μ l、ダイマーは400 μ lを、尾静脈より投与した。対照として、濾過滅菌したPBS（-）を同様に1日2回、3日間、200 μ l、尾静脈より投与した。両群とも、1群7匹で行った。

15 (5) scFv/CHOポリペプチドのモノマー及びダイマーのヒト骨髓腫移植マウスモデルに対する抗腫瘍効果の評価

scFv/CHOポリペプチドのモノマー及びダイマーのヒト骨髓腫マウスモデルの抗腫瘍効果については、当該骨髓腫細胞が産生するヒトIgG（Mタンパク質）のマウス血清中の量の変化、及び生存期間で評価した。マウス血清中のヒトIgG量の変化については、KPM2細胞移植後24日目に血清を採取し、上記(1)で述べたELISAを用いてヒトIgG量を測定した。その結果、PBS（-）投与群では、血清ヒトIgG（Mタンパク質）量が約8500 μ g/mlまで上昇しているのに対し、scFv/CHOダイマー投与群では対照群の1/10以下と顕著に低値であり、scFv/CHOダイマーがKPM2細胞の増殖を非常に強く抑制していることが示された（図32）。一方、生存期間についても図33に示すとおり、scFv/CHOダイマー投与群ではPBS（-）投与群と比較して顕著な生存期間の延長が認められた。

以上より、scFv/CHOダイマーがヒト骨髓腫マウスモデルに対して、抗

腫瘍効果を有することが示された。本発明の改変抗体である s c F v / C H O ダイマーの抗腫瘍効果は、当該改変抗体が有するアポトーシス誘起作用に基づくと考えられる。

5. 15 赤血球凝集試験

5 赤血球凝集試験及び赤血球凝集の判定法は、続生化学実験講座の免疫生化学研究法（日本生化学会編、東京化学同人）に準じて実施した。

健常人の血液をヘパリン処理した注射筒により採血し、P B S（－）により3回洗浄した後、P B S（－）にて最終濃度が2%の赤血球浮遊液を作製した。検査サンプルは、対照としてマウス I g G（Zymed 社製）を用い、M A B L－2 抗体、C H O 細胞産生の一本鎖 F v ポリペプチドモノマー、ダイマー、大腸菌産生の一本鎖 F v ポリペプチドのモノマーとダイマーを使用した。赤血球の凝集作用を検討するために、ファルコン社製のU底の96ウェルプレートを使用し、上記の抗体サンプルを50 μ l / ウェル添加した中に、2%赤血球浮遊液をさらに50 μ l 添加、混和し、37℃で2時間インキュベーション後、4℃で一昼夜保存し、凝集を判定した。また、対照として、P B S（－）を50 μ l / ウェル添加し、抗体サンプルと同様にして凝集試験を行った。抗体の最終濃度は、マウス I g G、M A B L－2 抗体は、0.01、0.1、1、10、100 μ g / ml、一本鎖 F v は、0.004、0.04、0.4、4、40、80 μ g / ml で大腸菌産生の一本鎖 F v ポリペプチドのダイマーのみさらに160 μ g / ml の用量を設定した。その結果は、下記の表2に示す通り、M A B L－2 抗体では、0.1 μ g / ml 以上で赤血球凝集が見られたのに対し、一本鎖 F v ポリペプチドではモノマー、ダイマー共に赤血球凝集は認められなかった。

表 2

赤血球凝集試験

	対照	0.01	0.1	1	10	100	(μg/mL)		
mIgG	-	-	-	-	-	-			
MABL-2(intact)	-	-	+	+++	+++	++			

	対照	0.004	0.04	0.4	4	40	80	(μg/mL)	
scFv/CHO モノマー	-	-	-	-	-	-	-		
scFv/CHO ダイマー	-	-	-	-	-	-	-		

	対照	0.004	0.04	0.4	4	40	80	160	(μg/mL)
scFv/E. coli モノマー	-	-	-	-	-	-	-	-	
scFv/E. coli ダイマー	-	-	-	-	-	-	-	-	

実施例 6 2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む改変抗体 $sc(Fv)_2$ 及び種々の長さのペプチドリンカーを有するMABL-2抗体 $scFv$

6. 1 MABL-2抗体 $sc(Fv)_2$ 発現プラスミドの構築

MABL-2抗体由来の2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む改変抗体 [$sc(Fv)_2$] を発現するプラスミドを作製するため、前述 pCHOM2 (MABL-2抗体由来の $scFv$ をコードするDNAを含む) を以下に示す通りPCR法により修飾し、得られたDNA断片をpCHOM2に導入した。

PCRに使用するプライマーは、センスプライマーとしてEF1αをコードするDNAにハイブリダイズするEF1プライマー (配列番号: 30) を使用し、アンチセンスプライマーとしてL鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つリンカー領域をコードするDNA配列 (配列番号: 19) 及びSalI制限酵素認識部位を有するVL LASプライマー (配列番号: 31) を使用した。

PCR溶液100μlは、10μlの10×PCR Buffer #1、1mM MgCl₂、0.2mM dNTPs (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ (以上東洋紡社製)、1μMの各プライマ

一、及び100 ngの鋳型DNA (pCHOM2) を含有する。PCR溶液を94℃にて30秒間、50℃にて30秒間及び74℃にて1分間、この順序で加熱した。この温度サイクルを30回反復した。

PCR生成物をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製し、Sal Iで消化し、得られたDNA断片をpBluescript KS⁺ベクター (東洋紡社製) にクローニングした。DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをSal Iで消化し、得られたDNA断片をSal Iで消化したpCHOM2にRapid DNA Ligation Kit (BOEHRINGER MANNHEIM 社製) を用いて連結した。DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをpCHOM2 (Fv)₂と命名した (図34を参照)。本プラスミドpCHOM2 (Fv)₂に含まれるMABL-2抗体sc (Fv)₂領域の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号: 32に示す。

6. 2 種々の長さのペプチドリンカーを有するMABL-2抗体scFv発現プラスミドの作製

種々の長さのペプチドリンカーを有し、そして[H鎖] - [L鎖] (以下HL)、[L鎖] - [H鎖] (以下LH) となるようにV領域を連結したscFvを、MABL-2由来のH鎖及びL鎖cDNAを鋳型として以下の通りに作製した。

HLタイプのscFvを作製するために、まずpCHOM2 (Fv)₂を鋳型としてCFHL-F1 (配列番号: 33) 及びCFHL-R2 (配列番号: 34) プライマー、CFHL-F2 (配列番号: 35) 及びCFHL-R1プライマー (配列番号: 036) によりKODポリメラーゼにて94℃30秒、60℃30秒、72℃1分間の反応を30回繰り返すPCR反応を行い、5'側にリーダー配列を含むH鎖、及び3'側にFLAG配列を含むL鎖のcDNA遺伝子を作製した。得られたH鎖及びL鎖cDNAを鋳型として混合し、KODポリメラーゼにて94℃30秒、60℃30秒、72℃1分間の反応を5回繰り返すPCR反応を行い、CFHL-F1及びCFHL-R1プライマーを加えてさらに30サイクル反応することによりリンカーを含まないHL-0タイプのcDNAを作製した。

LHタイプのscFvを作製するために、まずMABL-2のL鎖及びH鎖V

領域の cDNA を含むプラスミド pGEM-M2L 及び pGEM-M2H (特願
平 11-63557 参照) を鋳型として、それぞれ T7 (配列番号: 37) 及び
CF LH-R2 (配列番号: 38) プライマー、CF LH-F2 (配列番号: 3
9) 及び CF LH-R1 (配列番号: 40) プライマーを用いて KOD ポリメ
ラーゼ (東洋紡) にて 94℃ 30 秒、60℃ 30 秒、72℃ 1 分間の反応を 30 回
繰り返す PCR 反応を行い、5' 側にリーダー配列を含む L 鎖、及び 3' 側に FL
AG 配列を含む H 鎖の cDNA 遺伝子を作製した。得られた L 鎖及び H 鎖 cDN
A を鋳型として混合し、KOD ポリメラーゼにて 94℃ 30 秒、60℃ 30 秒、
72℃ 1 分間の反応を 5 回繰り返す PCR 反応を行い、T7 及び CF LH-R1
プライマーを加えてさらに 30 サイクル反応した。この反応産物を鋳型とし、C
F LH-F4 (配列番号: 41) 及び CF LH-R1 プライマーを用いて 94℃
30 秒、60℃ 30 秒、72℃ 1 分間の反応を 30 回繰り返す PCR 反応を行う
ことによりリンカーを含まない LH-0 タイプの cDNA を作製した。

こうして作製した LH-0、HL-0 タイプの cDNA を制限酵素 EcoRI、
BamHI (宝酒造) 処理し、XhoI 制限酵素切断部位を含まない哺乳動物発
現プラスミド INPEP4 に Ligation High (東洋紡) を用いて導入し、
Competent E. coli JM109 (ニッポンジーン) を形質転換した。形質転換し
た大腸菌より QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) にてプラスミドを精製した。
こうしてプラスミド pCF2LH-0 及び pCF2HL-0 を作製した。

次に、リンカーサイズの異なる発現プラスミドを作製するために HL タイプで
は pCF2HL-0 を鋳型として CFHL-X3 (配列番号: 42)、CFHL-X
4 (配列番号: 43)、CFHL-X5 (配列番号: 44)、CFHL-X6
(配列番号: 45)、又は CFHL-X7 (配列番号: 46) のセンスプライマー
及びアンチセンスプライマーとしてベクター配列に相補的な BGH-1 (配列番
号: 47) プライマーを用いて KOD ポリメラーゼにて 94℃ 30 秒、60℃ 3
0 秒、72℃ 1 分間の反応を 30 回繰り返す PCR 反応を行い、得られた反応産
物を制限酵素 XhoI、BamHI (宝酒造) にて処理した。得られた断片を p
CF2HL-0 の XhoI、BamHI サイトに Ligation High (東洋紡) を用

いて導入し、Competent *E. coli* JM109を形質転換した。形質転換した大腸菌より QIAGEN Plasmid Maxi Kit にてプラスミドを精製した。こうして、発現プラスミド pCF2HL-3、pCF2HL-4、pCF2HL-5、pCF2HL-6 及び pCF2HL-7 を作製した。更に COS7 細胞での一過的発現に用

5 いる発現プラスミドを作製するために、pCF2HL-0、pCF2HL-3、pCF2HL-4、pCF2HL-5、pCF2HL-6 及び pCF2HL-7 を制限酵素 *EcoRI* 及び *BamHI*（宝酒造）にて処理し、約 800bp の断片をアガロースゲル電気泳動によるゲルからの回収により精製した。得られた断片を哺乳動物細胞発現プラスミド pCOS1 の *EcoRI* 及び *BamHI* サイト

10 に Ligation High を用いて導入し、Competent *E. coli* DH5 α （東洋紡）を形質転換した。形質転換した大腸菌より QIAGEN Plasmid Maxi Kit にてプラスミドを精製した。こうして、発現プラスミド CF2HL-0/pCOS1、CF2HL-3/pCOS1、CF2HL-4/pCOS1、CF2HL-5/pCOS1、CF2HL-6/pCOS1 及び CF2HL-7/pCOS1 を作製した。代表的な例として、プラスミド CF2HL-0/pCOS1 の構造を図 35 に示し、

15 これに含まれる MABL2-scFv<HL-0>の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：48 に示す。また各プラスミドのリンカー部分の塩基配列及びアミノ酸配列を図 36 に示す。

また、リンカーサイズの異なる LH タイプの発現プラスミドを作製するため、

20 pCF2LH-0 を鋳型として CFLH-X3（配列番号：49）、CFLH-X4（配列番号：50）、CFLH-X5（配列番号：51）、CFLH-X6（配列番号：52）又は CFLH-X7（配列番号：53）のセンスプライマー及びアンチセンスプライマーとしてベクター配列に相補的な BGH-1 プライマーを用いて KOD ポリメラーゼにて 94℃30 秒、60℃30 秒、72℃1 分間の反応を 30 回繰り返す PCR 反応を行い、得られた反応産物を制限酵素 *XhoI*、

25 *BamHI* にて処理した。得られた断片を pCF2LH-0 の *XhoI*、*BamHI* サイトに Ligation High を用いて導入し、Competent *E. coli* DH5 α （東洋紡）を形質転換した。形質転換した大腸菌より QIAGEN Plasmid Maxi Kit にてプ

ラスミドを精製した。こうして、発現プラスミド pCF2LH-3、pCF2LH-4、pCF2LH-5、pCF2LH-6 及び pCF2LH-7 を作製した。更に COS 7 細胞での一過的発現に用いる発現プラスミドを作製するために、pCF2LH-0、pCF2LH-3、pCF2LH-4、pCF2LH-5、pCF2LH-6 及び pCF2LH-7 を制限酵素 EcoRI 及び BamHI (宝酒造) にて処理し、約 800bp の断片をアガロースゲル電気泳動によるゲルからの回収により精製した。得られた断片を哺乳動物細胞発現プラスミド pCOS1 の EcoRI 及び BamHI サイトに Ligation High を用いて導入し、Competent E. coli DH5α (東洋紡) を形質転換した。形質転換した大腸菌より QIAGEN Plasmid Maxi Kit にてプラスミドを精製した。こうして、発現プラスミド CF2LH-0/pCOS1、CF2LH-3/pCOS1、CF2LH-4/pCOS1、CF2LH-5/pCOS1、CF2LH-6/pCOS1 及び CF2LH-7/pCOS1 を作製した。代表的な例として、プラスミド CF2LH-0/pCOS1 の構造を図 37 に示し、これに含まれる MABL2-scFv<LH-0> の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号: 54 に示す。また各プラスミドのリンカー部分の塩基配列及びアミノ酸配列を図 38 に示す。

6. 3 COS 7 細胞における scFv 及び sc(Fv)₂ の発現

(1) 有血清培地での培養上清の調製

HL タイプ、LH タイプ scFv 及び sc(Fv)₂ の発現のために、COS 7 細胞 (JCRB 9127、ヒューマンサイエンス振興財団) での一過的発現を行った。COS 7 細胞は 10% 牛胎児血清 (HyClone) を含む DMEM 培地 (GIBCO BRL 社製) にて、37℃ の炭酸ガス恒温槽中で経代培養した。

6. 2 で構築した CF2HL-0, 3~7/pCOS1、もしくは CF2LH-0, 3~7/pCOS1 又は pCHOM2(Fv)₂ ベクターを、Gene Pulser 装置 (BioRad 社製) を用いてエレクトロポレーションにより COS 7 細胞にトランスフェクションした。

DNA (10µg) と DMEM (10% FBS, 5mM BES (SIGMA 社)) 培地中 2×10^7 細胞/ml の 0.25ml をキューベットに加え、10 分間静

置の後に0.17 kV、950 μ Fの容量にてパルスを与えた。10分間静置の後、エレクトロポレーションされた細胞をDMEM (10% FBS) 培地に混合し、75 cm^3 フラスコに加えた。72時間培養後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、更に0.22 μ m ボトルトップフィルター (FALCON) にて濾過し、これを培養上清 (CM) とした。

(2) 無血清培地での培養上清の調製

上記(1)と同様の方法でトランスフェクションした細胞をDMEM (10% FBS) 培地に加え75 cm^3 フラスコにて一夜培養した後、培養上清を捨て、PBSにて洗浄後、CHO-S-SFM II 培地 (GIBCO BRL 社製) を添加した。72時間培養後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、更に0.22 μ m ボトルトップフィルターにて濾過し、CMを得た。

6. 4 COS 7 CM中のscFv及びsc(Fv)₂の検出

前記6. 3 (2) で調製したCOS 7のCM中における種々のMABL 2-s cFv及びsc(Fv)₂のポリペプチドを下記の通りにウェスタンブロッティング法により検出した。

各COS 7 CMについてについてSDS-PAGEを行い、REINFORCED NC膜 (Schleicher & Schuell 社製) に転写した。5%スキムミルク (森永乳業社製) にてブロッキングを行い、TBSにて洗浄後、抗FLAG抗体 (SIGMA 社製) を加えた。室温にてインキュベーション及び洗浄の後、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体 (Jackson Immuno Research 社製) を加え、室温にてインキュベーション及び洗浄後、基質溶液を添加し、発色させた (図39)。

6. 5 フローサイトメトリー

MABL 2-s cFv及びsc(Fv)₂のヒトIntegrin Associated Protein (IAP) 抗原への結合を測定するため、前記6. 3 (1) にて調製したCOS 7細胞培養上清を用いてフローサイトメトリーを行った。ヒトIAPを発現するマウス白血病細胞株L1210細胞 2×10^5 個に、実施例6. 3 (1) で得られた培養上清あるいは対照としてCOS 7細胞の培養上清を加え、氷上にてインキュベーション及び洗浄の後、10 μ g/mlのマウス抗FLAG抗体 (SIGMA 社

製)を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、FITC標識抗マウスIgG抗体(BECTON DICKINSON 社製)を加えた。再度インキュベーション及び洗浄の後、FACSscan装置(BECTON DICKINSON 社製)にて蛍光強度を測定した。その結果、各COS7培養上清中の種々の長さのペプチドリンカーを有するMABL2-scFv及びsc(Fv)₂は、ヒトIAPに対して高い親和性を有することが示された(図40a及びb)。

6. 6 in vitroでのアポトーシス誘起効果

前記1. 3 (1)にて調製したCOS7細胞培養上清について、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞(hIAP/L1210)に対するアポトーシス誘導作用をAnnexin-V(BOEHRINGER MANNHEIM 社製)染色により検討した。

hIAP/L1210細胞 5×10^4 個に、各ベクターを形質転換したCOS7細胞培養上清あるいはコントロールとしてCOS7細胞培養上清を終濃度10%で添加し、24時間培養した。その後、Annexin-V/PI染色を行い、FACSscan装置(BECTON DICKINSON 社製)にて蛍光強度を測定した。その結果、COS7 CM中のscFv<HL3, 4, 6, 7、LH3, 4, 6, 7>及びsc(Fv)₂はhIAP/L1210細胞に対して顕著な細胞死を誘導した。得られた結果を図41にそれぞれ示す。

6. 7 MABL2-scFv及びsc(Fv)₂のCHO細胞用発現ベクターの構築

前記MABL2-scFv及びsc(Fv)₂を培養上清から精製することを目的として、これらをCHO細胞にて発現させるための発現ベクターを以下のように構築した。

前記1. 2にて調製したpCF2HL-0, 3~7及びpCF2LH-0, 3~7のEcoRI-BamHI断片を、CHO細胞用発現ベクターpCHO1のEcoRI及びBamHI部位にLigation Highを用いて導入し、Competent E. coli DH5αを形質転換した。形質転換した大腸菌よりQIAGEN Plasmid Midi Kit(QIAGEN)にてプラスミドを精製した。このようにして発現プラスミドpCH

OM2HL-0, 3~7及びpCHOM2LH-0, 3~7を作製した。

6. 8 MABL2-s c F v<HL-0, 3~7>、MABL2-s c F v<LH-0, 3~7>及びs c (F v)₂発現CHO細胞の作製並びにその培養上清の調製

5 前記1. 7にて構築した発現プラスミドpCHOM2HL-0, 3~7及びpCHOM2LH-0, 3~7並びにpCHOM2(F v)₂ベクターを以下の通りにCHO細胞に形質転換し、各改変抗体を恒常的に発現するCHO細胞を作製した。その代表的な例としてMABL2-s c F v<HL-5>、s c (F v)₂を恒常的に発現するCHO細胞の作製を下記に示す。

10 発現プラスミドpCHOM2HL-5及びpCHOM2(F v)₂を制限酵素Pvu Iにて消化して直鎖状にし、これらをGene Pulser装置(BioRad社製)を用いてエレクトロポレーションによりCHO細胞にトランスフェクションした。DNA(10µg)と、PBS中1×10⁷細胞/mlの0.75mlをキュベットに加え、1.5kV、25µFの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期

15 間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%のウシ胎児血清を含有する核酸含有α-MEM培地(GIBCO BRL社製)に加え培養した。一夜培養後、培養上清を除去し、PBSにてリンスした後、10%のウシ胎児血清を含有する核酸不含α-MEM培地(GIBCO BRL社製)を加え培養した。約2週間培養後、methotrexate(SIGMA社製)を終濃度10nMで含有する培地で更に培養し、そ

20 の後50nM、そして100nMと濃度を順次上げて培養を続けた。こうして得られた細胞をローラボトル中で無血清培地CHO-S-SFM II(GIBCO BRL社製)にて培養後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、更に0.20µmフィルターにて濾過し、それぞれのCMを得た。

同様にして、MABL2-s c F v<HL-0, 3, 4, 6, 7>及び<LH-0, 3, 4, 5, 6, 7>を恒常的に発現するCHO細胞及びそれらのCMを得た。

6. 9 MABL2-s c F v<HL-5>のダイマー及びs c (F v)₂の精製

下記の2種類の精製法により前記6. 8で得られたCMからMABL2-s c

Fv<HL-5>及びsc(Fv)₂の精製を行った。

<精製法1> HL-5及びsc(Fv)₂を、そのポリペプチドのC末端のFlag配列を利用した抗Flag抗体アフィニティカラムクロマトグラフィー及びゲル濾過を用いて精製した。150mM NaClを含む50mM Tris塩酸緩衝液、pH7.5 (TBS)で平衡化した抗Flag M2 Affinity gel (SIGMA)で作成したカラム(7.9ml)に前記6.8で得られたCM(1L)を添加し、TBSでカラムを洗浄後、0.1Mグリシン塩酸緩衝液、pH3.5でscFvをカラムから溶出させた。得られた画分をSDS/PAGEで分析し、scFvの溶出を確認した。scFv画分を終濃度が0.01%となるようにTween20を加え、Centricon-10 (MILLIPORE)で濃縮した。濃縮液を150mM NaCl及び0.01%Tween20を含む20mM 酢酸緩衝液、pH6.0で平衡化したTSK gel G3000 SWカラム(7.5×600mm)にかけた。流速0.4ml/minでscFvは280nmの吸収で検出した。HL-5は主要ピークとしてダイマーの位置に、sc(Fv)₂はモノマーの位置にそれぞれ溶出された。

<精製法2> HL-5及びsc(Fv)₂をイオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイト及びゲル濾過の三工程で精製した。イオン交換クロマトグラフィーでは、HL-5ではQ Sepharose fast flowカラム(ファルマシア)をsc(Fv)₂ではSP-sepharose fast flowカラムを用い、第二工程以降はHL-5とsc(Fv)₂で同じ条件を用いた。

(第一工程) HL-5

HL-5のCMは、0.02%Tween20を含む20mM Tris塩酸緩衝液、pH9.0で2倍希釈した後に、1M TrisでpHを9.0に調整した。この後、0.02%Tween20を含む20mM Tris塩酸緩衝液、pH8.5で平衡化したQ Sepharose fast flowカラムにかけ、同緩衝液中0.1Mから0.55MまでのNaClの直線濃度勾配でカラムに吸着したポリペプチドを溶出した。得られた画分をSDS/PAGEで分析し、HL-5を含む画分を集め、第二工程のハイドロキシアパタイトにかけた。

(第一工程) sc(Fv)₂

$s c(F v)_2$ のCMは、0.02% Tween 20を含む20mM 酢酸緩衝液、pH 5.5で2倍希釈した後に、1M酢酸でpHを5.5に調整した。0.02% Tween 20を含む20mM 酢酸緩衝液、pH 5.5で平衡化したSP-Sepahrose fast flow カラムにかけ、同緩衝液中、NaCl濃度を0から0.5Mまで直線的に上げ、カラムに吸着したポリペプチドを溶出した。得られた画分をSDS/PAGEで分析し、 $s c(F v)_2$ を含む画分を集め、第二工程のハイドロキシアパタイトにかけた。

(第二工程) HL-5及び $s c(F v)_2$ のハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー

第一工程で得られたHL-5画分及び $s c(F v)_2$ 画分をそれぞれ0.02% Tween 20を含む10mM リン酸緩衝液、pH 7.0で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム (BioRad、タイプI) に添加し、同緩衝液でカラムを洗浄後、リン酸緩衝液濃度を0.5Mまで直線的に上げ、カラムに吸着したポリペプチドを溶出した。各画分をSDS/PAGEで分析し、所望のポリペプチドが含まれる画分を集めた。

(第三工程) HL-5及び $s c(F v)_2$ のゲル濾過

第二工程で得られた各画分をそれぞれCentriprep-10 (MILLIPORE) で濃縮し、0.02% Tween 20及び0.15M NaClを含む20mM 酢酸緩衝液、pH 6.0で平衡化したSuperdex 200カラム (2.6×60cm、ファルマシア) にかけた。HL-5はダイマーに位置に、 $s c(F v)$ HL-5及び $s c(F v)_2$ はモノマーの位置にそれぞれ主要ピークとして溶出された。

いずれの精製法においても、HL-5モノマーは殆ど検出されなかったことから、一本鎖Fvのリンカーのアミノ酸残基数が5個程度であれば、効率的に一本鎖Fvのダイマーが形成できることが判明した。HL-5ダイマーおよび $s c(F v)_2$ はいずれも精製された後も4℃で1ヶ月間安定的に維持された。

6. 10 精製 $s c F v < HL-5 >$ のダイマー及び $s c(F v)_2$ の抗原結合活性評価

精製されたMABL 2- $s c F v < HL 5 >$ のダイマー及び $s c(F v)_2$ のヒト

Integrin Associated Protein (IAP) 抗原への結合を測定するため、フローサイトメトリーを行った。ヒト IAP を発現するマウス白血病細胞株 L1210 細胞 (hIAP/L1210) 又は対照として pCOS1 ベクターをトランスフェクションした L1210 細胞 (pCOS1/L1210) 2×10^5 個に、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製 MABL2-scFv<HL5>のダイマー、MABL2-sc(Fv)₂、陽性対照としてモノクローナル抗体 MABL-2、陰性対照としてマウス IgG (Zymed 社製) を加え、氷上にてインキュベーション及び洗浄の後、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のマウス抗 FLAG 抗体 (SIGMA 社製) を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (BECTON DICKINSON 社製) を加えた。再度インキュベーション及び洗浄の後、FACSscan 装置 (BECTON DICKINSON 社製) にて蛍光強度を測定した。

その結果、精製 MABL2-scFv<HL5>のダイマー及び MABL2-sc(Fv)₂ は hIAP/L1210 細胞に特異的に結合したことにより、scFv<HL5>のダイマー及び sc(Fv)₂ がヒト IAP に対して高い親和性を有することが示された (図 42)。

6. 11 精製 scFv<HL-5>のダイマー及び sc(Fv)₂ の in vitro アポトーシス誘起効果

精製した MABL2-scFv<HL5>のダイマー及び sc(Fv)₂ について、ヒト IAP を遺伝子導入した L1210 細胞 (hIAP/L1210) 及びヒト白血病細胞株 CCRF-CEM に対するアポトーシス誘導作用を Annexin-V (BOEHRINGER MANNHEIM 社製) 染色により検討した。

hIAP/L1210 細胞 5×10^4 個あるいは CCRF-CEM 細胞 1×10^5 個に、精製 MABL2-scFv<HL5>のダイマー、MABL2-sc(Fv)₂、陽性対照としてモノクローナル抗体 MABL-2、陰性対照としてマウス IgG を様々な濃度で添加し、24 時間培養した。その後、Annexin-V 染色を行い、FACSscan 装置 (BECTON DICKINSON 社製) にて蛍光強度を測定した。その結果、MABL2-scFv<HL5>のダイマー及び MABL2-sc(Fv)₂ は hIAP/L1210、CCRF-CEM の両細胞に対して濃度依

存的に細胞死を誘導した（図43）。この結果、MABL2-scfv<HL5>のダイマー及びMABL2-scfv₂は、もとのモノクローナル抗体MABL-2と比較して改善されたアポトーシス誘導作用を有することが示された。

6. 12 精製scfv<HL-5>のダイマー及びscfv₂の赤血球凝集試

5 験

実施例5. 15に従って、種々の濃度の精製したscfv<HL-5>のダイマー及びscfv₂の血液凝集試験を実施した。

モノクローナル抗体MABL-2（陽性対照）では血液凝集が起こるのに対して、一本鎖抗体のMABL2-scfv₂及びMABL2-scfv<HL5>は凝集しなかった。また、MABL-2抗体を用いた緩衝液の差もほとんどみられなかった。その結果を下記の表3に示す。

10

表 3

ヒト赤血球凝集試験

希釈液: PBS															(μ g/ml)	
MABL 2-sc (Fv) 2	cont	28.9	14.45	7.225	3.6125	1.8063	0.9031	0.4516	0.2258	0.1129	0.0564	0.0282	0.0141	0.0071	0.0035	0.0018
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MABL 2-sc (Fv) <HL5>	cont	28.0	14.0	7.0	3.5	1.75	0.875	0.4375	0.2188	0.1094	0.0547	0.0273	0.0137	0.0068	0.0034	0.0017
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MABL 2 (intact)	cont	80	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.1563	0.0781	0.0391	0.0195	0.0098	0.0049
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-
mIgG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
希釈液: Acetate Buffer															(μ g/ml)	
MABL 2 (intact)	cont	80	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.1563	0.0781	0.0391	0.0195	0.0098	0.0049
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

6. 13 精製 s c F v < H L - 5 > のダイマー及び s c (F v)₂ のヒト骨髓腫マウスモデルに対する抗腫瘍効果

実施例 6. 8 及び 6. 9 にて作製、精製した s c F v < H L - 5 > のダイマー及び s c (F v)₂ について、その抗腫瘍効果を試験した。具体的には実施例 5. 14 (3) で作製したヒト骨髓腫マウスモデルを用いて、マウス血清中における、ヒト骨髓腫細胞が産生する M タンパク質を E L I S A により定量し、併せてマウスの生存日数を記録した。そして、血清中の M タンパク質量の変化および生存日数により、s c F v < H L - 5 > のダイマー及び s c (F v)₂ の抗腫瘍効果を評価した。

なお、本試験において H L - 5 及び s c (F v)₂ は、v e h i c l e (1 5 0 m M N a C l , 0 . 0 2 % T w e e n 及び 2 0 m M 酢酸緩衝液, p H 6 . 0) 中の 0 . 0 1 、 0 . 1 又は 1 m g / m l の溶液として、投与量が 0 . 1 、 1 または 1 0 m g / k g になるようにマウスに投与した。また、対照は v e h i c l e のみを投与した。

ヒト骨髓腫細胞移植後 2 6 日目に血清を採取し、血清中の M タンパク質量を E L I S A により実施例 5. 14 に従って測定した。その結果、H L - 5 投与群及びダイマー及び s c (F v)₂ 投与群共に、血清中の M タンパク質量が投与量依存的に減少していた (図 4 4 を参照) 。また、その生存期間については、H L - 5 投与群 (図 4 5) 及び s c (F v)₂ 投与群 (図 4 6) 共に対照 (v e h i c l e 投与群) と比較して有意な生存期間の延長が観察された。これらの結果は、本発明の H L - 5 及び s c (F v)₂ がインビボにおいても優れた抗腫瘍作用を有することを示している。

実施例 7 ヒト M P L に対するヒト抗体 1 2 B 5 の H 鎖 V 領域及び L 鎖 V 領域を含む一本鎖 F v

ヒト M P L に対するヒトモノクローナル抗体 1 2 B 5 の V 領域をコードする D N A を次のようにして構築した。

7. 1 1 2 B 5 H 鎖 V 領域をコードする遺伝子の構築

ヒトMPLに結合するヒト抗体12B5H鎖V領域をコードする遺伝子は、該遺伝子の塩基配列（配列番号55）を用いて、その5'末端にヒト抗体遺伝子由来のリーダー配列（配列番号56）（Eur. J. Immunol. 1996; 26: 63-69）を連結させることで設計した。設計した塩基配列はそれぞれ15bpのオーバーラップ配列を持つように4本のオリゴヌクレオチド（12B5VH-1、12B5VH-2、12B5VH-3、12B5VH-4）に分割し、12B5VH-1（配列番号57）及び12B5VH-3（配列番号：59）はセンス方向で、12B5VH-2（配列番号：58）及び12B5VH-4（配列番号：60）はアンチセンス方向でそれぞれ合成した。各合成オリゴヌクレオチドはそれぞれの相補性によりアッセムブリさせた後、外側プライマー（12B5VH-S及び12B5VH-A）を加え、全長の遺伝子を増幅した。なお、12B5VH-S（配列番号：61）は前方プライマーでリーダー配列の5'末端にハイブリダイズし、且つHind III 制限酵素認識配列ならびにコザック配列を持つように、また12B5VH-A（配列番号：62）は後方プライマーでH鎖V領域のC末端をコードする塩基配列にハイブリダイズし、且つスプライドナー配列ならびにBamHI 制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。

PCR溶液100 μ lは、10 μ lの10 \times PCR Gold Buffer II、1.5mM MgCl₂、0.08mM dNTPs（dATP、dGTP、dCTP、dTTP）、5ユニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq Gold（以上 PERKIN ELMER 社製）、2.5ピコモル [p mole] ずつの合成オリゴヌクレオチド12B5VH-1～4を含有し、94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて9分間そして次に94 $^{\circ}$ Cにて2分間、55 $^{\circ}$ Cにて2分間及び72 $^{\circ}$ Cにて2分間のサイクルを2回反復した後、100pmoleずつの外側プライマー12B5VH-S及び12B5VH-Aを加え、さらに94 $^{\circ}$ Cにて30秒間、55 $^{\circ}$ Cにて30秒間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分間のサイクルを35回反復した後、反応混合物を更に72 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した。

PCR生成物は1.5%低融点アガロースゲル（Sigma 社製）を用い精製した後、制限酵素BamHI及びHind IIIで消化し、ヒトH鎖発現ベクターHEF- γ 1にクローニングした。DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDN

A断片を含むプラスミドをHEF-12B5H-gY1と命名した。

さらに、HEF-12B5H-gY1を制限酵素EcoRIならびにBamHIで消化し、12B5VHをコードする遺伝子を調製した後、ヒトFabH鎖発現ベクターpCOS-Fdに挿入しpFd-12B5Hを得た。なお、ヒトFabH鎖発現ベクターはヒト抗体H鎖V領域と定常領域をコードする遺伝子間に存在するイントロン領域ならびにヒトH鎖定常領域の一部をコードする遺伝子を含むDNA（配列番号63）をPCR法を用い増幅した後、動物細胞発現ベクターpCOS1に挿入することで構築したベクターである。ヒトH鎖定常領域はHEF-gY1を鋳型とし、上記と同様の条件下にて遺伝子の増幅を行い、前方プライマーとしてイントロン1の5'端の配列とハイブリダイズし、且つEcoRI及びBamHI制限酵素認識配列を有するように設計したG1CH1-S（配列番号64）を、後方プライマーとしてヒトH鎖定常領域CH1ドメインの3'端のDNAにハイブリダイズし、且つヒンジ領域の一部をコードする配列、二個の停止コドンおよびBglII制限酵素認識部位を有するように設計したG1CH1-A（配列番号65）を用いた。

プラスミドHEF-12B5H-gY1及びpFd-12B5Hに含まれる再構成12B5H鎖可変領域の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：66に示す。

7. 2 12B5L鎖V領域をコードする遺伝子の構築

ヒトMPLに結合するヒト抗体12B5L鎖V領域をコードする遺伝子は、該遺伝子の塩基配列（配列番号67）を用い、その5'末端にヒト抗体遺伝子3D6（Nuc. Acid Res. 1990: 18; 4927）由来のリーダー配列（配列番号68）を連結させることで設計した。設計した塩基配列は上記と同様にそれぞれ15bpのオーバーラップ配列を持つように4本のオリゴヌクレオチド（12B5VL-1、12B5VL-2、12B5VL-3、12B5VL-4）に分割し、それぞれ合成した。12B5VL-1（配列番号：69）及び12B5VL-3（配列番号：71）はセンス配列、12B5VL-2（配列番号：70）及び12B5VL-4（配列番号：72）はアンチセンス配列を有し、各合成オリゴヌクレオチドはそれぞれの相補性によりアセンブリさせた後、外側プライマー（12B5

V L-S及び1 2 B 5 V L-A)を加え、全長の遺伝子を増幅した。なお、1 2 B 5 V L-S (配列番号: 7 3) は前方プライマーでリーダー配列の5'末端にハイブリダイズし、且つH i n d III 制限酵素認識配列ならびにコザック配列を持つように、また1 2 B 5 V L-A (配列番号: 7 4) は後方プライマーでL鎖V領域のC末端をコードする塩基配列にハイブリダイズし、且つスプライスドナー配列ならびにB a m H I 制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。

P C R反応は上記と同様に行い、P C R生成物は1.5%低融点アガロースゲル (Sigma 社製) を用い精製した後、制限酵素B a m H I 及びH i n d III で消化し、ヒトL鎖発現ベクターH E F-g κ にクローニングした。DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをH E F-1 2 B 5 L-g κ と命名した。本プラスミドH E F-1 2 B 5 L-g κ に含まれる再構成1 2 B 5 L鎖V領域の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号: 7 5に示す。

7. 3 再構成1 2 B 5一本鎖F_v(s c F_v)の作製

再構成1 2 B 5抗体一本鎖F_vは1 2 B 5 V H-リンカー-1 2 B 5 V Lの順とし、そのC末端には検出及び精製を容易にするためにF L A G配列 (配列番号: 7 6) を付加することで設計した。さらに、リンカー配列は(G l y₄S e r)₃の1 5アミノ酸からなるリンカー配列を用い、再構成1 2 B 5一本鎖F_v(s c 1 2 B 5)を構築した。

(1) 1 5アミノ酸からなるリンカー配列を用いた再構成1 2 B 5一本鎖F_vの作製

1 5アミノ酸からなるリンカーを用いた再構成1 2 B 5抗体一本鎖F_vをコードする遺伝子は1 2 B 5 H鎖V領域、リンカー領域、及び1 2 B 5 L鎖V領域をそれぞれP C R法を用いて増幅し、連結することにより構築した。この方法を図4 7に模式的に示す。再構成1 2 B 5一本鎖F_vの作製のために6個のP C Rプライマー (A~F) を使用した。プライマーA、C及びEはセンス配列を有し、プライマーB、D及びFはアンチセンス配列を有する。

H鎖V領域のための前方プライマー1 2 B 5-S (プライマーA、配列番号: 7 7) は、H鎖リーダー配列の5'末端にハイブリダイズし且つE c o R I 制限酵

素認識部位を有するように設計した。H鎖V領域のための後方プライマーH u V H J 3（プライマーB、配列番号：78）は、H鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズするように設計した。

リンカーのための前方プライマーR H u J H 3（プライマーC、配列番号：79）は、リンカーのN末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つH鎖V領域のC末端をコードするDNAとオーバーラップするように設計した。リンカーのための後方プライマーR H u V K 1（プライマーD、配列番号：80）は、リンカーのC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つL鎖V領域のN末端をコードするDNAとオーバーラップするように設計した。

L鎖V領域のための前方プライマーH u V K 1. 2（プライマーE、配列番号：81）はL鎖V領域のN末端をコードするDNAにハイブリダイズするように設計した。L鎖V領域のための後方プライマー1 2 B 5 F - A（プライマーF、配列番号：82）は、L鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つF L A G ペプチドをコードする配列（Hopp, T. P. ら、Bio/Technology, 6, 1204-1210, 1988）、2個の転写停止コドン及びN o t I 制限酵素認識部位を有するように設計した。

第一PCR段階において3つの反応A-B、C-D及びE-Fを行い、そして第一PCRから得られた3つのPCR生成物をそれら自体の相補性によりアッセンブリさせた。次に、プライマーA及びFを加えて、15アミノ酸からなるリンカーを用いた再構成1 2 B 5 - 本鎖F v をコードする全長DNAを増幅した（第二PCR）。なお、第一PCRにおいては、再構成1 2 B 5 H鎖V領域をコードするプラスミドH E F - 1 2 B 5 H - g Y 1（実施例7. 1を参照）、G l y G l y G l y G l y S e r G l y G l y G l y G l y S e r G l y G l y G l y G l y S e r からなるリンカー領域をコードするDNA配列（配列番号：83）（Huston, J. S. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5879-5883, 1988）を含んで成るプラスミドp S C F V T 7 - h M 2 1（ヒト型化O N S - M 2 1抗体）（Ohtomo, T. ら、Anticancer Res. 18 (1998), 4311-4316）、及び再構成1 2 B 5 L鎖V領域をコードするプラスミドH E F - 1 2 B 5 L - g K

(実施例 7. 2 を参照) をそれぞれ鋳型として用いた。

第一 PCR 段階の溶液 50 μ l は、5 μ l の 10 \times PCR Gold Buffer II、1.5 mM MgCl₂、0.08 mM dNTPs、5 ユニットの DNA ポリメラーゼ AmpliTaq Gold (以上 PERKIN ELMER 社製)、100 pmol ずつの各プライマー及び 100 ng の各鋳型 DNA を含有し、94 $^{\circ}$ C の初期温度にて 9 分間そして次に 94 $^{\circ}$ C にて 30 秒間、55 $^{\circ}$ C にて 30 秒間及び 72 $^{\circ}$ C にて 1 分間のサイクルを 35 回反復した後、反応混合物を更に 72 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱した。

PCR 生成物 A-B、C-D、及び E-F は第二 PCR でアッセムブリした。第二 PCR において、鋳型として 1 μ l の第一 PCR 反応物 A-B、0.5 μ l の PCR 反応物 C-D 及び 1 μ l の PCR 反応物 E-F、10 μ l の 10 \times PCR Gold Buffer II、1.5 mM MgCl₂、0.08 mM dNTPs、5 ユニットの DNA ポリメラーゼ AmpliTaq Gold (以上 PERKIN ELMER 社製) を含有する 98 μ l の PCR 混合液を、94 $^{\circ}$ C の初期温度にて 9 分間そして次に 94 $^{\circ}$ C にて 2 分間、65 $^{\circ}$ C にて 2 分間及び 72 $^{\circ}$ C にて 2 分間のサイクルを 2 回反復した後、それぞれ 100 pmol ずつのプライマー A 及び F を加えた。そして 94 $^{\circ}$ C にて 30 秒間、55 $^{\circ}$ C にて 30 秒間及び 72 $^{\circ}$ C にて 1 分間のサイクルを 35 回反復した後、反応混合物を 72 $^{\circ}$ C にて 5 分間加熱した。

第二 PCR により生じた DNA 断片を 1.5% 低融点アガロースゲルを用いて精製し、EcoRI 及び NotI で消化し、得られた DNA 断片を pCHO1 ベクターおよび pCOS1 ベクター (特願平 8-255196) にクローニングした。なお、本発現ベクター pCHO1 は、DHFR- Δ E-rvH-PM1-f (WO 92/19759 参照) から、EcoRI 及び SmaI 消化により抗体遺伝子を削除し、EcoRI-NotI-BamHI Adaptor (宝酒造社製) を連結することにより構築したベクターである。DNA 配列決定の後、再構成 12 B5-一本鎖 Fv の正しいアミノ酸配列をコードする DNA 断片を含むプラスミドを pCHO-sc12B5 及び pCOS-sc12B5 と命名した。本プラスミド pCHO-sc12B5 及び pCOS-sc12B5 に含まれる再構成 12 B5-一本鎖 Fv の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号: 84 に示す。

7. 4 動物細胞を用いた各 1 2 B 5 抗体 (I g G、F a b) 及び一本鎖 F v ポリペプチドの発現

1 2 B 5 抗体 (I g G、F a b) 及び 1 2 B 5 抗体由来の一本鎖 F v (ポリペプチド) は COS-7 細胞又は CHO 細胞を用い発現させた。

- 5 COS-7 細胞を用いた一過的な発現は次のようにして行った。すなわち、Gene Pulser 装置 (BioRad 社製) を用いたエレクトロポレーション法により遺伝子導入した。1 2 B 5 抗体 (I g G) の発現には前述の発現ベクター H E F - 1 2 B 5 H - g Y 1 及び H E F - 1 2 B 5 L - g K 各 1 0 μ g ずつを、1 2 B 5 F a b 断片の発現には p F d - 1 2 B 5 H と H E F - 1 2 B 5 L - g K 各 1 0 μ g ずつを、一本鎖 F v の発現には p C O S - s c 1 2 B 5 (1 0 μ g) を P B S に懸濁した COS-7 細胞 (1×10^7 細胞 / m l) 0.8 m l に混合し、キュベットに加え、1.5 k V、25 μ F D の容量にてパルスを与えた。室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10 % のウシ胎児血清を含有する DMEM 培地 (G I B C O B R L 社製) に加え培養した。終夜培養後、細胞を P B S で一回洗浄し、さらに無血清培地 CHO-S-SFM II 培地を加え、さらに 2 日間培養した。培養上清を遠心し細胞破砕物を除去した後、0.22 μ m のフィルターを通すことで調製した。

- 20 また、1 2 B 5 抗体由来の一本鎖 F v (ポリペプチド) の恒常的発現 CHO 細胞株を樹立するため、p C H O - s c 1 2 B 5 発現ベクターを下記のように CHO 細胞に遺伝子導入した。

- 25 すなわち、Gene Pulser 装置 (BioRad 社製) を用いたエレクトロポレーション法により発現ベクターを CHO 細胞に導入した。制限酵素 P v u I で消化し直鎖状にした DNA (1 0 0 μ g) と P B S に懸濁した CHO 細胞 (1×10^7 細胞 / m l) の 0.8 m l を混合したものをキュベットに加え氷中で 10 分間静置した後、1.5 k V、25 μ F D の容量にてパルスを与えた。室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10 % のウシ胎児血清を含有する CHO-S-SFM II (G I B C O B R L 社製) に加え培養した。培養 2 日後に 5 n M メトトレキサート (SIGMA 社製) ならびに 10 % ウシ胎児血清を含む CH

〇-S-S FM II (GIBCO BRL 社製) にて培養した。得られたクローンについて
発現量の高いクローンを 1 2 B 5 一本鎖 F v の産生細胞株として選択した。5 n
M メトトレキサート (SIGMA 社製) を含む無血清培地 CHO-S-S FM II
(GIBCO BRL 社製) にて培養後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除
5 去して培養上清を得た。

7. 5 CHO細胞産生の 1 2 B 5 由来の一本鎖 F v の精製

7. 4 で得られた 1 2 B 5 一本鎖 F v 発現 CHO 産生株の培養上清からの精
製は、抗 F L A G 抗体カラム及びゲル濾過カラムにより行った。

(1) 抗 F L A G 抗体カラム

10 培養上清は、P B S で平衡化した抗 F L A G M2 アフィニティーゲル (SIGMA
社製) に添加した。同緩衝液でカラムを洗浄後、緩衝液を 0. 1 M グリシン塩酸緩
衝液 (p H 3. 5) でカラムに吸着した蛋白質を溶出した。溶出画分は、溶出後直
ちに 1 M トリス塩酸緩衝液 (p H 8. 0) を加えて中和した。S D S-P A G E で
15 溶出画分を分析し、一本鎖 F v が確認された画分を Centricon-10 (MILLIPORE 社
製) を用いて濃縮した。

(2) ゲル濾過

(1) の濃縮液は、0. 0 1 % T w e e n 2 0 を含む P B S で平衡化した S u p
e r d e x 2 0 0 カラム (1 0 × 3 0 0 mm、AMERSHAM PHARMACIA 社製) に添加
した。

20 s c 1 2 B 5 は 2 つのピーク (A、B) に分かれて溶出した (図 4 8 を参照)。
画分 A、B を 1 4 % - S D S - ポリアクリルアミドゲルを用いて分析した。サン
プルを還元剤添加、非添加で処理し、L a e m m l i の方法に準じて電気泳動を
行い、泳動後蛋白質をクマシーブリリアントブルー染色した。図 4 9 に示すよう
に、画分 A、B いずれも還元剤の添加の有無に関わらず、見かけ上の分子量約 3
25 1 k D に単一バンドを与えた。画分 A 及び B を S u p e r d e x 2 0 0 P C 3.
2 / 3 0 (3. 2 × 3 0 0 mm、AMERSHAM PHARMACIA 社製) を用いたゲル濾過によ
り分析した結果、画分 A では見かけ上の分子量約 4 4 k D、画分 B では同 2 2 k
D に溶出された (図 5 0 a 及び b を参照)。以上の結果から、画分 A は s c 1 2 B

5 一本鎖F_vの非共有結合性ダイマーで、Bはモノマーである。

7. 6 各種一本鎖F_vのTPO様アゴニスト活性の測定

ヒトTPO受容体(MPL)を発現するBa/F3細胞(BaF/mp1)に対する増殖活性を測定することによって、抗MPL一本鎖抗体のTPO様活性を評価した。

- 5 BaF/Mp1細胞を、1%ウシ胎児血清(GIBCO社製)を含むRPMI1640培地(GIBCO社製)で2回洗浄したのち、 5×10^5 細胞/mlの細胞密度になるように培地に懸濁した。抗MPL一本鎖抗体またはヒトTPO(R&D Systems社製)を培地で適当に希釈し、細胞懸濁液50 μ lに抗体またはヒトTPO希釈液50 μ lを加えて96穴マイクロウェル平底プレート(Falcon社製)に分注し、
- 10 CO₂インキュベーター(CO₂濃度:5%)で24時間培養した。培養後、WST-8試薬(生細胞数測定試薬SF:ナカライテスク社製)を10 μ l加え、直後に蛍光吸光光度計SPECTRA Fluor(TECAN社製)を用いて測定波長450nm、対照波長620nmの吸光度を測定した。CO₂インキュベーター(CO₂濃度:5%)で2時間インキュベートした後、SPECTRA Fluorを用いて再度測定波長450nm、対照波長620nmの吸光度を測定した。WST-8試薬は生細胞数に応じて波長450nmの発色反応を呈することから、2時間の吸光度変化を指標にBaF/Mp1増殖活性を次のように算出したED50値により評価した。
- 15 先ず、縦軸を吸光度、横軸を抗体濃度とし、その増殖反応曲線がプラトーに達した吸光度を反応率100%とした。反応率50%付近の数値に基づく直線近似により近似式を得て、これから反応率50%となる抗体濃度を算出し、これをED50値とした。
- 20

- 各種12B5抗体分子を発現させたCOS-7細胞の培養上清を用い、MPLに対するアゴニスト活性を測定した結果、図51に示すように抗原結合部位が二価である12B5 IgGでは濃度依存的に吸光度の上昇が認められTPO様のアゴニスト活性を示したのに対し(ED50;29nM)、抗原結合部位が一価である12B5 Fabのアゴニスト活性は非常に弱いものであった(ED50;34,724nM)。それに対し、Fabと同様に抗原結合部位が一価である一本鎖F_v(sc12B5)においてはED50値が75nMと強いアゴニスト活性が認め
- 25

られた。しかしながら、一本鎖F_vではH鎖、L鎖各可変領域は非共有結合で介合しているために、溶液中で各可変領域が解離し他の分子の可変領域と介合し二量体等の多量体を形成することが知られている。そこで、ゲル濾過を用い精製s c 1 2 B 5の分子量を測定した結果、確かに単量体（モノマー）と二量体（ダイマー）と考えられる分子が認められた（図48を参照）。続いて、モノマーとダイマーのs c 1 2 B 5をそれぞれ単離し（図50を参照）、それらのMPLに対するアゴニスト活性を測定した結果、図51及び52に示すようにs c 1 2 B 5モノマーではED₅₀値が4438.7 nMとCOS-7細胞の培養上清を用いた結果に比べ、アゴニスト活性の減弱が確認された。それに対し、二価の抗原結合部位を持つ一本鎖F_v（s c 1 2 B 5ダイマー）では一価のs c 1 2 B 5に対し約400倍強いアゴニスト活性を示した（ED₅₀；10.1 nM）。さらに、二価の一本鎖F_vではヒトTPOならびに1 2 B 5 I g Gのアゴニスト活性と同等もしくはそれ以上のアゴニスト活性を示した。

実施例8 （ヒトMPLに対するヒト抗体1 2 E 1 0可変領域をコードする遺伝子の構築）

ヒトMPLに対するヒトモノクローナル抗体1 2 E 1 0の可変領域をコードするDNAを次のようにして構築した。

8. 1 1 2 E 1 0 H鎖可変領域をコードする遺伝子の構築

ヒトMPLに結合するヒト抗体1 2 E 1 0 H鎖可変領域をコードする遺伝子はWO 99/10494に記載のアミノ酸配列（配列番号85）を基に配列番号86に示す塩基配列を設計した。さらに、その5'端にヒト抗体遺伝子由来のリーダー配列（配列番号87）（GenBank accession No. AF062252）を連結させることで全長の塩基配列を設計した。設計した塩基配列はそれぞれ15bpのオーバーラップ配列を持つように4本のオリゴヌクレオチド（1 2 E 1 0 V H 1、1 2 E 1 0 V H 2、1 2 E 1 0 V H 3、1 2 E 1 0 V H 4）に分割し、1 2 E 1 0 V H 1（配列番号：88）及び1 2 E 1 0 V H 3（配列番号：90）はセンス方向で、1 2 E 1 0 V H 2（配列番号：89）及び1 2 E 1 0 V H 4（配列番号：91）はアンチセンス方向でそれぞれ合成した。各合

成オリゴヌクレオチドはそれぞれの相補性によりアッセンブリさせた後、外側プライマー（12E10VHS及び12E10VHA）を加え、全長の遺伝子を増幅した。なお、12E10VHS（配列番号：92）は前方プライマーでリーダー配列の5'端にハイブリダイズし、且つHindIII制限酵素認識配列ならびにコザック配列を持つように、また12E10VHA（配列番号：93）は後方プライマーでH鎖可変領域のC末端をコードする塩基配列にハイブリダイズし、且つスプライドナー配列ならびにBamHI制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。

PCR溶液100 μ lは、10 μ lの10 \times PCR Gold Buffer II、1.5mM MgCl₂、0.08mM dNTPs（dATP, dGTP, dCTP, dTTP）、5ユニットのDNAポリメラーゼAmpliTaq

Gold（以上PERKIN ELMER社製）、2.5ピコモルずつの合成オリゴヌクレオチド12B5VH-1～4を含有し、94℃の初期温度にて9分間そして次に94℃にて2分間、55℃にて2分間及び72℃にて2分間のサイクルを2回反復した後、100pmoleずつの外側プライマー12E10VHS及び12E10VHAを加え、さらに94℃にて30秒間、55℃にて30秒間及び72℃にて1分間のサイクルを35回反復した後、反応混合物を更に72℃で5分間加熱した。

PCR生成物は1.5%低融点アガロースゲル（Sigma社製）を用い精製した後、制限酵素BamHI及びHindIIIで消化し、ヒトH鎖発現ベクターHEF-gY1にクローニングした。DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをHEF-12E10H-gY1と命名した。

さらに、HEF-12E10H-gY1を制限酵素EcoRIならびにBamHIで消化し、12E10VHをコードする遺伝子を調製した後、ヒトFabH鎖発現ベクターpCOS-Fdに挿入しpFd-12E10Hを得た。なお、ヒトFabH鎖発現ベクターはヒト抗体H鎖V領域と定常領域をコードする遺伝子間に存在するイントロン領域ならびにヒトH鎖定常領域の一部をコードする遺伝子を含むDNA（配列番号63）についてPCR法を用いて増幅した後、動物細胞

発現用ベクター pCOS1 に挿入することで構築したベクターである。ヒトH鎖定常領域は HEF-gY1 を鋳型とし、上記と同様の条件下にて遺伝子の増幅を行い、前方プライマーとしてイントロン1の5'端の配列とハイブリダイズし、且つ EcoRI 及び BamHI 制限酵素認識配列を有するように設計した G1CH1-S (配列番号64) を、後方プライマーとしてヒトH鎖定常領域 CH1ドメインの3'端のDNAにハイブリダイズし、且つヒンジ領域の一部をコードする配列、二個の停止コドンおよび BglII 制限酵素認識部位を有するように設計した G1CH1-A (配列番号65) を用いた。

プラスミド HEF-12E10H-gY1 及び pFd-12E10H に含まれる再構成 12E10H 鎖可変領域の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：94 に示す。

8. 2 12E10L 鎖可変領域をコードする遺伝子の構築

ヒトMPLに結合するヒト抗体 12E10L 鎖可変領域をコードする遺伝子は WO99/10494 に記載のアミノ酸配列 (配列番号95) を基に配列番号96 に示す塩基配列を設計した。さらに、その5'端にヒト抗体遺伝子由来のリーダー配列 (配列番号97) (Mol. Immunol. 1992; 29:1515-1518) を連結させることで設計した。設計した塩基配列は上記と同様にそれぞれ 15bp のオーバーラップ配列を持つように4本のオリゴヌクレオチド (12E10VL1、12E10VL2、12E10VL3、12E10VL4) に分割し、それぞれ合成した。12E10VL1 (配列番号：98) 及び 12E10VL3 (配列番号：100) はセンス配列、12E10VL2 (配列番号：99) 及び 12E10VL4 (配列番号：101) はアンチセンス配列を有し、各合成オリゴヌクレオチドはそれぞれの相補性によりアッセンブリさせた後、外側プライマー (12E10VLS 及び 12E10VLA) を加え、全長の遺伝子を増幅した。なお、12E10VLS (配列番号：102) は前方プライマーでリーダー配列の5'端にハイブリダイズし、且つ EcoRI 制限酵素認識配列ならびにコザック配列を持つように、また 12E10VLA (配列番号：103) は後方プライマーでL鎖可変領域のC末端をコードする塩基配列にハイブリダイズし、

且つB l n I 制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。

P C R 反応は上記と同様に行い、P C R 生成物は1.5%低融点アガロースゲル (Sigma 社製) を用い精製した後、制限酵素E c o R I 及びB l n I で消化し、ヒトラムダ鎖定常領域遺伝子を含有するp U C 1 9 ベクターにクローニングした。

- 5 DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドを制限酵素E c o R I で消化し、1 2 E 1 0 L 鎖可変領域及びヒトラムダ鎖定常領域をコードする遺伝子を調製し、さらに発現ベクターp C O S 1 に挿入し、1 2 E 1 0 L 鎖遺伝子 (配列番号: 1 0 4) を持つプラスミドをp C O S - 1 2 E 1 0 L と命名した。

10 8. 3 再構成1 2 E 1 0 一本鎖F v の作製

- 再構成1 2 E 1 0 抗体一本鎖F v は1 2 E 1 0 V H - リンカー - 1 2 E 1 0 V L の順とし、そのC末端には検出及び精製を容易にするためにF L A G 配列 (配列番号: 1 0 5) を付加することで設計した。リンカー配列は (G l y₄S e r)₃ の1 5 アミノ酸からなるリンカー配列、またはを (G l y₄S e r)₁ の5 アミノ酸からなるリンカー配列用い、再構成1 2 E 1 0 鎖F v (s c 1 2 E 1 0 および d b 1 2 E 1 0) を構築した。
- 15

(1) 5 アミノ酸からなるリンカー配列を用いた再構成1 2 E 1 0 一本鎖F v の作製

- 5 アミノ酸からなるリンカー配列を用いた再構成1 2 E 1 0 一本鎖F v をコードする遺伝子は1 2 E 1 0 H 鎖V 領域をコードする遺伝子の3'端、及び1 2 E 1 0 L 鎖V 領域をコードする遺伝子の5'端に (G l y₄S e r)₁ からなるリンカーをコードする塩基配列を付加させた遺伝子についてそれぞれP C R 法を用いて増幅し、連結することにより構築した。再構成1 2 E 1 0 一本鎖F v の作製のために4 個のP C R プライマー (A ~ D) を使用した。プライマーA 及びC はセンス配列を有し、プライマーB およびD はアンチセンス配列を有する。
- 20
- 25

H 鎖V 領域のための前方プライマーは1 2 E 1 0 S (プライマーA、配列番号: 1 0 6) を用い、H 鎖V 領域のための後方プライマーD B 2 (プライマーB、配列番号: 1 0 7) は、H 鎖V 領域のC末端をコードするDNA にハイブリダイ

ズし、且つ (G l y₄S e r)₁ からなるリンカーをコードする塩基配列ならびに L 鎖 V 領域の N 末端をコードする塩基配列を有するように設計した。

L 鎖 V 領域のための前方プライマー DB 1 (プライマー C、配列番号: 1 0 8) は L 鎖 V 領域の N 末端をコードする DNA にハイブリダイズし、且つ (G l y₄S e r)₁ からなるリンカーをコードする塩基配列ならびに H 鎖 V 領域の C 末端をコードする塩基配列を有するように設計した。L 鎖 V 領域のための後方プライマーは 1 2 E 1 0 F A (プライマー D、配列番号: 1 0 9) は L 鎖可変領域 C 末端をコードする DNA にハイブリダイズし、且つ F L A G をコードする塩基配列を有し、さらに N o t I 制限酵素認識部位を有するように設計した。

第一 P C R 段階において 2 つの反応 A-B 及び C-D を行い、そして第一 P C R から得られた 2 つの P C R 生成物をそれら自体の相補性によりアッセンブリさせた。次に、プライマー A 及び D を加えて、5 アミノ酸からなるリンカーを用いた再構成 1 2 E 1 0 一本鎖 F_v をコードする全長 DNA を増幅した (第二 P C R)。なお、第一 P C R においては、再構成 1 2 E 1 0 H 鎖 V 領域をコードするプラスミド H E F-1 2 E 1 0 H-g_Y1 (実施例 8. 1 を参照) 及び再構成 1 2 E 1 0 L 鎖 V 領域をコードするプラスミド p C O S-1 2 E 1 0 L (実施例 8. 1 を参照) をそれぞれ鋳型として用いた。

第一 P C R 段階の溶液 5 0 μ l は、5 μ l の 1 0 × P C R G o l d B u f f e r I I、1. 5 m M M g C l₂、0. 0 8 m M d N T P s、5 ユニットの D N A ポリメラーゼ A m p l i T a q G o l d (以上 PERKIN ELMER 社製)、1 0 0 ピコモルずつの各プライマー及び 1 0 0 n g の各鋳型 DNA を含有し、9 4 ° C の初期温度にて 9 分間そして次に 9 4 ° C にて 3 0 秒間、5 5 ° C にて 3 0 秒間及び 7 2 ° C にて 1 分間のサイクルを 3 5 回反復した後、反応混合物を更に 7 2 ° C で 5 分間加熱した。

P C R 生成物 A-B (4 2 9 b p) 及び C-D (3 9 5 b p) は第二 P C R でアッセンブリした。第二 P C R において、鋳型として 1 μ L ずつの第一 P C R 反応物 A-B 及び P C R 反応物 C-D、1 0 0 ピコモルずつの各プライマー、1 0 μ l の 1 0 × P C R G o l d B u f f e r I I、1. 5 m M M g C l₂、0. 0 8

mM dNTPs、5ユニットのDNAポリメラーゼAmpliTaq

Gold（以上PERKIN ELMER社製）を含有する98 μ lのPCR混合液を、上記と同様の条件下で反応させた。

第二PCRにより生じた795bpのDNA断片について1.5%低融点アガロースゲルを用いて精製した後、EcoRI及びNotIで消化し、得られたDNA断片をpCHO1ベクターまたはpCOS1ベクターにクローニングした。なお、本発現ベクターpCHO1は、DHFR- Δ E-RVH-PM1-f（WO 92/19759参照）から、EcoRI及びSmaI消化により抗体遺伝子を削除し、EcoRI-NotI-BamHI Adaptor（宝酒造社製）を連結することにより構築したベクターである。DNA配列決定の後、再構成12B5一本鎖Fvの正しいアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドをpCHO-db12E10、及びpCOS-db12E10と命名した。本プラスミドpCHO-db12E10及びpCOS-db12E10に含まれる再構成12E10一本鎖Fvの塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：110に示す。

（2）15アミノ酸からなるリンカー配列を用いた再構成12E10一本鎖Fvの作製

15アミノ酸からなるリンカー配列を用いた再構成12E10一本鎖Fvをコードする遺伝子は12E10H鎖V領域をコードする遺伝子の3'端、及び12E10L鎖V領域をコードする遺伝子の5'端にそれぞれ（Gly₄Ser）₃からなるリンカーをコードする塩基配列を付加させた遺伝子について、それぞれPCR法を用いて増幅し、連結することにより構築した。再構成12E10一本鎖Fvの作製のために4個のPCRプライマー（A～D）を使用した。プライマーA及びCはセンス配列を有し、プライマーBおよびDはアンチセンス配列を有する。

H鎖V領域のための前方プライマーは12E10S（プライマーA、配列番号：106）を用い、H鎖V領域のための後方プライマーsc4.3（プライマーB、配列番号：111）は、H鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし、且つ（Gly₄Ser）₃からなるリンカーをコードする塩基配列なら

びにL鎖V領域のN末端をコードする塩基配列を有するように設計した。

L鎖V領域のための前方プライマー s c 1.3 (プライマーC、配列番号: 112) はL鎖V領域のN末端をコードするDNAにハイブリダイズし、且つ (Gly₄Ser)₃ からなるリンカーをコードする塩基配列ならびにH鎖V領域のC末端をコードする塩基配列を有するように設計した。L鎖V領域のための後方プライマーは12E10FA (プライマーD、配列番号: 109) はL鎖可変領域C末端をコードするDNAにハイブリダイズし、且つFLAGをコードする塩基配列を有し、さらにNotI制限酵素認識部位を有するように設計した。

第一PCR段階において2つの反応A-B及びC-Dを行い、そして第一PCRから得られた2つのPCR生成物をそれら自体の相補性によりアッセンブリさせた。次に、プライマーA及びDを加えて、15アミノ酸からなるリンカーを用いた再構成12E10一本鎖Fvをコードする全長DNAを増幅した (第二PCR)。なお、第一PCRにおいては、再構成12E10一本鎖FvをコードするプラスミドpCOS-db12E10 (実施例8.1 (1)を参照) を鋳型として用いた。

第一PCR段階の溶液50 μ lは、5 μ lの10 \times ExTaq Buffer、0.4mM dNTPs、2.5ユニットのDNAポリメラーゼTaKaRa

ExTaq (以上宝酒造社製)、100ピコモルずつの各プライマー及び10ngの各鋳型DNAを含有し、94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて30秒間そして次に94 $^{\circ}$ Cにて15秒間及び72 $^{\circ}$ Cにて2分間のサイクルを5回、94 $^{\circ}$ Cにて15秒間及び70 $^{\circ}$ Cにて2分間のサイクルを5回、94 $^{\circ}$ Cにて15秒間及び68 $^{\circ}$ Cにて2分間のサイクルを28回反復した後、反応混合物を更に72 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した。

PCR生成物A-B (477bp) 及びC-D (447bp) は第二PCRでアッセンブリした。第二PCRにおいて、鋳型として1 μ Lずつの第一PCR反応物A-B及びPCR反応物C-D、100ピコモルずつのプライマーA及びD、5 μ lの10 \times ExTaq Buffer、0.4mM dNTPs、2.5ユニットのDNAポリメラーゼTaKaRa ExTaq (以上宝酒造社製) を混合し、上記と同様の条件下で反応させた。

第二PCRにより生じた825bpのDNA断片について1.0%低融点アガロースゲルを用いて精製し、EcoRI及びNotIで消化し、得られたDNA断片をpCHO1ベクターまたはpCOS1ベクターにクローニングした。DNA配列決定の後、再構成12E10一本鎖Fvの正しいアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドをpCHO-sc12E10及びpCOS-sc12E10と命名した。本プラスミドpCHO-sc12E10及びpCOS-sc12E10に含まれる再構成12E10一本鎖Fvの塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：113に示す。

8.4 動物細胞を用いた各12E10抗体(IgG、Fab)及び一本鎖Fv

ポリペプチドの発現

12E10抗体(IgG、Fab)ならびに12E10抗体由来の一本鎖Fv(リンカー配列5アミノ酸、15アミノ酸)はCOS-7細胞もしくはCHO細胞を用い発現させた。

COS-7細胞を用いた一過的な発現は次のようにして行った。すなわち、Gene Pulser II装置(BioRad社製)を用いたエレクトロポレーション法により遺伝子導入した。12E10抗体(IgG)の発現には前述の発現ベクターHEF-12E10H-gY1及びpCOS-12E10L各10µgずつを、12E10Fab断片の発現にはpFd-12E10HとpCOS-12E10L各10µgずつを、一本鎖Fvの発現にはpCOS-sc12E10(10µg)またはpCOS-db12E10(10µg)をPBSに懸濁したCOS-7細胞(1×10^7 細胞/ml)0.8mlに混合したものをキュベットに加え、1.5kV、25µFDの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%のウシ胎児血清を含有するDMEM培地(GIBCO BRL社製)に加え培養した。終夜培養後、細胞をPBSで一回洗浄し、さらに無血清培地CHO-S-SFMI I培地(GIBCO BRL社製)を加え、さらに3日間培養した。培養上清を遠心し細胞破碎物を除去した後、0.22µmのフィルターを通すことで調製した。

また、12E10抗体由来の一本鎖Fv(ポリペプチド)の恒常的発現CHO

細胞株を樹立するため、pCHO-s c 1 2 E 1 0またはpCHO-d b 1 2 E 1 0発現ベクターをそれぞれCHO細胞に遺伝子導入した。

各発現ベクターを、Gene Pulser II装置 (BioRad 社製) を用いた
エレクトロポレーション法によりCHO細胞に遺伝子導入した。PvuI消化に
5 より直鎖状にしたDNA (100 μ g) とPBSに懸濁したCHO細胞 (1×10^7
細胞/ml) の0.8mlを混合したものをキュベットに加え、氷中で10分間静
置した後、1.5kV、25 μ FDの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間
の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%の透析ウシ
胎児血清ならびに核酸を含有するCHO-S-SFMI I 培地 (GIBCO BRL 社製)
10 に加え培養した。培養2日後に10%の透析ウシ胎児血清を含有する核酸不含C
HO-S-SFMI I 培地 (GIBCO BRL 社製) にて培養した。得られたクローンに
ついて発現量の高いクローンを12E10一本鎖Fvの産生細胞株として選択し
た。この細胞株を無血清培地CHO-S-SFMI I 培地 (GIBCO BRL 社製) に
て培養後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去後に、0.22 μ mの
15 フィルターを通すことで培養上清を調製した。

8. 5 CHO細胞産生の12E10由来の一本鎖Fvの精製

実施例8. 4で得た一本鎖Fv発現CHO産生株 (s c 1 2 E 1 0, d b 1 2 E 1 0) それぞれの培養上清から抗FLAG抗体カラム、及びゲルろ過カラムを用いて一本鎖Fvを精製した

20 (1) 抗FLAG抗体カラムを用いた精製

培養上清 (s c 1 2 E 1 0, d b 1 2 E 1 0) を、それぞれ150mM NaCl
を含む50mMトリス-塩酸緩衝液 (pH7.4) にて平衡化した抗FLAG
M2 アフィニティゲル (SIGMA社製) カラムに添加し、同緩衝液でカラムを
洗浄後、100mM グリシン緩衝液 (pH3.5) でカラムに吸着した蛋白質を
25 溶出した。溶出画分は直ちに1M トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) を加えて中和
した。SDS-PAGEで各溶出画分を分析し、一本鎖Fvが確認された画分を、
それぞれプールし、Centricon-10 (アミコン社製) を用いて約20
倍濃縮した。

(2) ゲル濾過

(1) の画分を、0.01% Tween 20 含む PBS で平衡化した Superdex 200 HR カラム (10 x 300 mm、Amersham Pharmacia 社製) に添加した。クロマトグラムを図 5 3 および 5 4 に示す。その結果、
5 sc 1 2 E 1 0 においては 2 つのピーク (A, B) が検出された (図 5 3)。また、
db 1 2 E 1 0 では、2 つのピーク (C, D) が検出された (図 5 4)。それぞれのピーク画分を分取し、還元剤添加、非添加で処理し、Laemmli の方法に
準じて電気泳動を行い、泳動後蛋白質をクマシーブリリアントブルー染色した。
図 5 5 に示すように、画分 A、画分 B、画分 C、画分 D いずれも還元剤の添加の
10 有無に関わらず、見かけ上の分子量約 31 kD に単一バンドを与えた。これらの
画分を、前述の Superdex 200 HR カラムを用いたゲルろ過で分析した
結果、画分 A は見かけ上の分子量約 20 kD、画分 B は同 42 kD に溶出された
(図 5 6 を参照)。一方、画分 C は見かけ上の分子量約 69 kD、画分 D は同 41
kD に溶出された (図 5 7 を参照) 以上の結果から、sc 1 2 E 1 0 由来の画分
15 A は一本鎖 F_v の非共有結合性ダイマーで、画分 B は一本鎖 F_v のモノマーであ
り、また、db 1 2 E 1 0 由来の画分 C は一本鎖 F_v の非共有結合性トリマー、
画分 D は一本鎖 F_v の非共有結合性ダイマーであることが示唆された。

8. 6 各種一本鎖 F_v の TPO 様アゴニスト活性の測定

ヒト TPO 受容体 (MPL) を発現する Ba/F3 細胞 (BaF/mp1) に対する増
殖活性を測定することによって、抗 mp1 一本鎖抗体の TPO 様活性の評価を行
った。

BaF/mp1 細胞を、1% ウシ胎児血清 (GIBCO 社製) を含む RPMI 1640 培地 (GIBCO 社製) で 2 回洗浄したのち、 5×10^5 細胞/mL の細胞密度にな
るように培地に懸濁した。抗 MPL 一本鎖抗体またはヒト TPO (R&D Systems
社製) を培地で適当に希釈し、細胞懸濁液 50 μ L に抗体またはヒト TPO 希釈液
25 50 μ L を加えて 96 穴マイクロウェル平底プレート (Corning 社製) に分注し、
CO₂ インキュベーター (CO₂ 濃度: 5%) で 24 時間培養した。培養後、WS
T-8 試薬 (生細胞数測定試薬 SF: ナカライテスク社製) を 10 μ L 加え、直後

に吸光光度計 Benchmark Plus (BioRad 社製) を用いて測定波長 450 nm、対照波長 655 nm の吸光度を測定した。CO₂ インキュベーター (CO₂ 濃度 : 5%) で 2 時間 インキュベートした後、Benchmark Plus を用いて再度測定波長 450 nm、対照波長 655 nm の吸光度を測定した。WST-8 試薬は生細胞数
5 に応じて波長 450 nm の発色反応を呈することから、2 時間の吸光度変化を指標に B a F / m p 1 細胞増殖活性を評価した。

各種 12E10 抗体分子を発現させた COS-7 細胞の培養上清を用い、MPL に対するアゴニスト活性を測定した結果を図 58 に示す。リンカー配列 5 アミノ酸 (d b 12E10) および 15 アミノ酸 (s c 12E10) の一本鎖 F v では濃度依存的に吸光度の上昇が認められ、TPO 様のアゴニスト活性を示したの
10 に対し (ED50 ; それぞれ 9 pM および 51 pM)、12E10 I g G および 12E10 F a b では全く活性が認められなかった。

一本鎖 F v はリンカー配列の長さによっては、H 鎖と L 鎖が分子内だけでなく、分子間でも介合することによって二量体等の多量体を形成することが知られている。そこで、12E10 一本鎖 F v を発現させた CHO 細胞の培養上清をゲルろ過分画して、MPL に対するアゴニスト活性を測定した。その結果を図 59 に示す。s c 12E10 中にわずかに含まれる二量体 (s c 12E10 ダイマー、ED50 ; 1.9 pM) は単量体 (s c 12E10 モノマー、ED50 ; >10 nM) に比べて、5000 倍以上強い TPO 様アゴニスト活性を示し、その活性は
15 TPO (ED50 ; 27 pM) よりも強かった。また、d b 12E10 の二量体 (d b 12E10 ダイマー、ED50 ; 2.0 pM) は s c 12E10 ダイマーとほぼ同等の強い活性を示した。ゲルろ過分子量から三量体と推定された d b 12E10 トリマー (ED50 ; 7.4 pM) も d b 12E10 ダイマーには劣るが
20 高い活性を示した。以上の結果から、アゴニスト抗体 12E10 の活性には、抗原結合部位が二価 (ダイマー) であることが重要と考えられるが、12E10 I g G には活性が見られなかったことから、単に二価であるだけでなく、抗原結合部位間の距離や角度といった要素も重要と推測される。

図面の簡単な説明

図 1. ヒト IgG1 抗体が、ヒト IAP を発現する L1210 細胞 (hIAP / L1210) に結合しないことを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

5 図 2. キメラ MABL-1 抗体が、ヒト IAP を発現する L1210 細胞 (hIAP / L1210) に特異的に結合することを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

図 3. キメラ MABL-2 抗体が、ヒト IAP を発現する L1210 細胞 (hIAP / L1210) に特異的に結合することを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

図 4. 本発明にかかる一本鎖 Fv の作成方法を模式的に示す図である。

図 5. 本発明の一本鎖 Fv をコードする DNA を、大腸菌にて発現させるために使用可能な発現プラスミドの一例の構造を示す。

15 図 6. 本発明の一本鎖 Fv をコードする DNA を、哺乳動物細胞にて発現させるために使用する発現プラスミドの一例の構造を示す。

図 7. 実施例 5. 4 で得られたウエスタンブロットの結果を示す図である。左側より、分子量マーカー (上から 97.4、66、45、31、21.5、14.5 kDa を示す)、pCHO1 導入 COS7 細胞培養上清、pCHOM2 導入細胞培養上清。pCHOM2 導入細胞培養上清に再構成 MABL-2 抗体一本鎖 Fv (矢印) が明らかに含まれていることを示す。

図 8. コントロールとしての pCHO1 / COS7 細胞培養上清の抗体は、コントロールとしての pCOS1 / L1210 細胞には結合しないことを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

25 図 9. MABL2-scFv / COS7 細胞培養上清の抗体は、コントロールとしての pCOS1 / L1210 細胞には結合しないことを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

図 10. コントロールとしての pCOS1 / COS7 細胞培養上清の抗体は、hIAP / L1210 細胞に結合しないことを示すフローサイトメトリーの結果を

示す図である。

図 1 1. MABL 2-s c F v / COS 7 細胞培養上清の抗体は、h I A P / L 1 2 1 0 細胞に特異的に結合することを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

5 図 1 2. 実施例 5. 6 で示す C o m p e t i t i v e E L I S A の結果を示す図であり、本発明の一本鎖 F v (MABL 2-s c F v) の抗原結合活性を、コントロールとしての p C H O 1 / COS 7 細胞培養上清と比較して、マウスモノクローナル抗体 MABL-2 の抗原結合に対する阻害を指標として示す図である。

10 図 1 3. 実施例 5. 7 のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、コントロールとしての p C O S 1 / L 1 2 1 0 細胞には、コントロールとしての p C H O 1 / COS 7 細胞培養上清抗体はアポトーシスを誘起しないことを示す。

図 1 4. 実施例 5. 7 のアポトーシス誘導効果の結果を示す図であり、コントロールとしての p C O S 1 / L 1 2 1 0 細胞には、MABL 2-s c F v / COS 7 細胞培養上清抗体はアポトーシスを誘起しないことを示す。

15 図 1 5. 実施例 5. 7 のアポトーシス誘導効果の結果を示す図であり、h I A P / L 1 2 1 0 細胞には、コントロールとしての p C H O 1 / COS 7 細胞培養上清抗体はアポトーシスを誘起しないことを示す。

20 図 1 6. 実施例 5. 7 のアポトーシス誘導効果の結果を示す図であり、h I A P / L 1 2 1 0 細胞に対し、MABL 2-s c F v / COS 7 細胞培養上清抗体が特異的にアポトーシスを誘起することを示す。

図 1 7. 実施例 5. 7 のアポトーシス誘導効果の結果を示す図であり、C C R F- C E M 細胞には、コントロールとしての p C H O 1 / COS 7 細胞培養上清抗体はアポトーシスを誘起しないことを示す (最終濃度 5 0 %)。

25 図 1 8. 実施例 5. 7 のアポトーシス誘導効果の結果を示す図であり、C C R F- C E M 細胞に対し、MABL 2-s c F v / COS 7 細胞培養上清抗体が特異的にアポトーシスを誘起することを示す (最終濃度 5 0 %)。

図 1 9. 実施例 5. 9 の C H O 細胞産生の MABL-2 抗体由来の一本鎖 F v の精製過程において、Blue-sepharose カラムで得られた画分をハイドロキシアパタ

イトカラムを用いて精製した際のクロマトグラムを示す図であり、主要なピークとして画分A、画分Bが得られたことを示す。

図20. 実施例5. 9の(2)で得られた画分A、画分Bについてゲル濾過により精製した結果を示す図であり、画分Aでは見かけ上の分子量約36 kD、画分Bでは同76 kDの位置に主要ピークが(それぞれA I 及びB I) が溶出したことを示す。

図21. 実施例5. 9のCHO細胞産生のMABL-2抗体由来の一本鎖F_vの精製過程において得られた画分をSDS-PAGEで分析した図であり、何れも分子量約35 kDに単一のバンドのみであることを示す。

10 図22. CHO細胞産生のMABL-2抗体由来の一本鎖F_vの精製において得られた画分A I 及びB I をゲル濾過により分析した結果を示す図であり、画分A I はモノマーからなり、画分B I はダイマーからなることを示す。

図23. 本発明の一本鎖F_vをコードするDNAを、大腸菌の菌体内にて発現させるために使用可能な発現プラスミドの一例の構造を示す。

15 図24. 実施例5. 12の大腸菌細胞産生のMABL-2抗体由来の一本鎖F_vポリペプチドの精製において、得られた粗製物をゲル濾過カラムを用いて精製した結果を示す図であり、各ピークはそれぞれ大腸菌細胞産生の一本鎖F_vのモノマー、ダイマーを示す。

20 図25. 実施例5. 13のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、h I A P/L1210細胞には、コントロールとしてのマウスIgG抗体はアポトーシスを誘起しないことを示す(最終濃度3 μg/ml)。

図26. 実施例5. 13のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、h I A P/L1210細胞に対し、CHO細胞産生のMABL2-scF_vダイマーが顕著にアポトーシスを誘起することを示す(最終濃度3 μg/ml)。

25 図27. 実施例5. 13のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、h I A P/L1210細胞に対し、大腸菌細胞産生のMABL2-scF_vダイマーが顕著にアポトーシスを誘起することを示す(最終濃度3 μg/ml)。

図28. 実施例5. 13のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、h I A

P/L 1 2 1 0細胞には、CHO細胞産生のMAB L 2 - s c F vモノマーのアポトーシス誘起作用がコントロールと同程度であることを示す（最終濃度 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）。

図 2 9．実施例 5．1 3 のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、h I A P/L 1 2 1 0細胞には、大腸菌細胞産生のMAB L 2 - s c F vモノマーのアポトーシス誘起作用がコントロールと同程度であることを示す（最終濃度 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）。

図 3 0．実施例 5．1 3 のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、h I A P/L 1 2 1 0細胞には、コントロールとしてのマウス I g G抗体は抗F L A G抗体の添加によってもアポトーシスを誘起しないことを示す（最終濃度 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）。

図 3 1．実施例 5．1 3 のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、h I A P/L 1 2 1 0細胞に対し、CHO細胞産生のMAB L 2 - s c F vモノマーが抗F L A G抗体の添加によって顕著にアポトーシスを誘起することを示す（最終濃度 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）。

図 3 2．ヒト骨髓腫細胞株K P M M 2を移植したマウスの血清中のヒト I g G量を定量したものであり、マウスにおけるヒト骨髓腫により産生されるヒト I g Gの量を測定した結果を示す図であり、s c F v/CHOダイマーがK P M M 2細胞の増殖を非常に強く抑制していることを示す。

図 3 3．腫瘍移植後のマウスの生存日数を表しており、s c F v/CHOダイマー投与群において生存期間が顕著に延長されていることを示している。

図 3 4．MAB L - 2抗体由来の2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む改変抗体 $[\text{s c}(\text{F v})_2]$ を発現するプラスミドの一例の構造を示す。

図 3 5．[H鎖] - [L鎖] となるようにV領域を連結し、且つペプチドリンカーを含まない s c F v (H Lタイプ) を発現するプラスミドの一例の構造を示す。

図 3 6．H Lタイプのポリペプチドの構造およびペプチドリンカーのアミノ酸配列を示す。

図 3 7．[L鎖] - [H鎖] となるようにV領域を連結し、且つペプチドリンカー

を含まない s c F v (LHタイプ) を発現するプラスミドの一例の構造を示す。

図 3 8. LHタイプのポリペプチドの構造およびペプチドリンカーのアミノ酸配列を示す。

図 3 9. 実施例 6. 4におけるウェスタンブロッティングの結果を示す図であり、
5 2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む改変抗体 s c (F v)₂及び種々の長さのペプチドリンカーを有するMABL-2抗体 s c F vが発現していることを示す。

図 4 0 a 及び b. 実施例 6. 3 (1) にて調製したCOS 7細胞培養上清を用いたフローサイトメトリーの結果を示す図であり、種々の長さのペプチドリンカー
10 を有するMABL 2-s c F v及びs c (F v)₂は、ヒトIAPに対して高い親和性を有することを示す。

図 4 1. 実施例 6. 6のアポトーシス誘導効果の結果を示す図であり、s c F v <HL 3, 4, 6, 7, LH 3, 4, 6, 7>及びs c (F v)₂はhIAP/L1
210細胞に対して顕著な細胞死を誘導することを示す。

図 4 2. 実施例 6. 10の抗原結合評価の結果を示す図であり、s c F v <HL
15 5>のダイマー及びs c (F v)₂がヒトIAPに対して高い親和性を有すること示す。

図 4 3. 実施例 6. 11のin vitro アポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、
MABL 2-s c F v <HL 5>のダイマー及びMABL 2-s c (F v)₂はhI
20 AP/L1210、CCRF-CEMの両細胞に対して濃度依存的に細胞死を誘導することを示す。

図 4 4. ヒト骨髓腫細胞株KPM2を移植したマウスにおけるヒト骨髓腫により
25 産生される血清中のMタンパク質の量を測定した結果を示す図であり、s c F v <HL-5>及びs c (F v)₂がKPM2細胞の増殖を非常に強く抑制していることを示す。

図 4 5. 腫瘍移植後のマウスの生存日数を表しており、s c F v <HL-5>投
与群において生存期間が顕著に延長されていることを示している。

図 4 6. 腫瘍移植後のマウスの生存日数を表しており、s c (F v)₂投与群におい

て生存期間が顕著に延長されていることを示している。

図47. 15アミノ酸からなるリンカー配列を含む再構成12B5一本鎖FvをコードするDNA断片の構築方法とその構造を概略的に示す。

図48. 実施例7. 5 (1) で得られた各12B5一本鎖Fvを、ゲル濾過により精製した結果を示す図であり、sc12B5では2つのピーク（画分A, B）に分かれた結果を示す。

図49. 実施例7. 5 (2) において、各画分AおよびBをSDS-PAGEにより分析した結果を示す。

図50. 実施例7. 5 (2) において、各画分AおよびBをSuperdex 200カラムにより分析した結果を示し、(a) 画分Aでは見かけ上の分子量約44 kDに、(b) 画分Bでは同22 kDの位置に主要ピークが溶出されたことを示す。

図51. sc12B5及び12B5抗体 (IgG, Fab) のTPO様アゴニスト活性の測定結果を示し、12B5 IgG及び一価一本鎖Fv (sc12B5) は、濃度依存的にTPO様のアゴニスト活性を有することを示す。

図52. sc12B5モノマー及びダイマーのTPO様アゴニスト活性の測定結果を示し、二価の抗原結合部位を持つ一本鎖Fv (sc12B5ダイマー) は一価のsc12B5より約400倍以上強いアゴニスト活性を示し、その強さはヒトTPOと同等もしくはそれ以上であることを示す。

図53. 得られたsc12E10一本鎖抗体をSuperdex 200HRカラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーで精製した結果を示す図であり、12E10 sc3では、2つのピーク（画分A, B）に分かれた結果を示す。

図54. 得られたdb12E10一本鎖抗体をSuperdex 200HRカラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーで精製した結果を示す図であり、12E10 sc3では、2つのピーク（画分C, D）に分かれた結果を示す。

図55. 画分A, B (sc12E10) および画分C, D (db12E10) を還元、非還元条件下におけるSDS-PAGE分析した結果を示す。

図56. 画分A, Bを、Superdex 200HRカラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーで分析した結果を示す。(1) 画分Aでは、見かけ上の分子量4

2 k D に (2) 画分 B では、同 2 0 k D の位置に、主要ピークが溶出されたことを示す。

図 5 7 . 画分 C , D を、S u p e r d e x 2 0 0 H R カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーで分析した結果を示す。(1) 画分 C では、見かけ上の分子量 6 9 k D に (2) 画分 B では、同 4 1 k D の位置に、主要ピークが溶出されたことを示す。

図 5 8 . 各種 1 2 E 1 0 抗体分子の M P L に対するアゴニスト活性を示すグラフであり、一本鎖 F v (s c 1 2 E 1 0 , d b 1 2 E 1 0) では T P O 様のアゴニスト活性を示したのに対し、1 2 E 1 0 I g G および 1 2 E 1 0 F a b では全く活性が認められなかったことを示す。

図 5 9 . s c 1 2 E 1 0 モノマーおよびダイマー、並びに d b 1 2 E 1 0 ダイマーおよびトリマーの M P L に対するアゴニスト活性を示すグラフであり、s c 1 2 E 1 0 ダイマー、d b 1 2 E 1 0 ダイマーおよびトリマーの T P O 様アゴニスト活性が T P O よりも強力であることを示す。

産業上の利用可能性

本発明の改変抗体は、細胞表面上の分子を架橋することにより該細胞内にシグナルを伝達しうるアゴニスト作用を有しており、また抗体分子 (w h o l e I g G) と比較して低分子化が達成されているため、組織、腫瘍への移行性に優れているという特徴を有している。さらに本発明によれば、T P O や親抗体 (w h o l e I g G) より顕著に高いアゴニスト活性を有する改変抗体が提供される。特に、親抗体分子でアゴニスト活性が認められない場合においても T P O より高いアゴニスト活性を有する改変抗体が提供できる。従って、当該改変抗体はシグナル伝達アゴニストとして使用することができ、そして抗体分子を本発明の改変抗体にすることにより、細胞間の架橋などによる副作用を軽減し、且つ細胞表面上の分子を架橋して所望の作用のみを誘起しうる新規な医薬品が提供される。本発明の改変抗体を有効成分とする医薬製剤は、血小板減少が関与する血液疾患、癌や白血病等の化学治療後の血小板減少症などの予防及び／又は治療薬として有

用である。

請求の範囲

1. TPOレセプターを架橋することによりTPOアゴニスト作用を示す、抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む改変抗体。
- 5 2. H鎖V領域及びL鎖V領域がリンカーを介して連結されている、請求項1記載の改変抗体。
3. リンカーが、少なくとも1個以上のアミノ酸からなるペプチドリンカーである、請求項2または3記載の改変抗体。
4. 改変抗体が、1つのH鎖V領域及び1つのL鎖V領域を含む一本鎖F_vのマルチマーから構成される請求項1～3のいずれか1項に記載の改変抗体。
- 10 5. 改変抗体が、一本鎖F_vのテトラマー、トリマーまたはダイマーから構成される請求項4に記載の改変抗体。
6. 改変抗体が、一本鎖F_vのダイマーから構成される請求項5に記載の改変抗体。
- 15 7. 同じ鎖上のH鎖V領域及びL鎖V領域は互いに連合して1つの抗原結合部位を形成していない、請求項4～6のいずれかに記載の改変抗体。
8. 改変抗体が、2つ以上のH鎖V領域及び2つ以上のL鎖V領域を含む一本鎖ポリペプチドである請求項1～3のいずれか1項に記載の改変抗体。
9. 改変抗体が、2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む一本鎖ポリペプチドである請求項8に記載の改変抗体。
- 20 10. 改変抗体が、さらにポリペプチド精製のためのアミノ酸配列を含む請求項1～9のいずれか1項に記載の改変抗体。
11. 改変抗体が精製されたものである、請求項1～10のいずれか1項に記載の改変抗体。
- 25 12. H鎖V領域及び／又はL鎖V領域が、ヒト抗体のH鎖V領域及び／又はL鎖V領域である請求項1～11のいずれか1項に記載の改変抗体。
13. H鎖V領域及び／又はL鎖V領域が、ヒト型化されたH鎖V領域及び／又はL鎖V領域である請求項1～11のいずれか1項に記載の改変抗体。

- 1 4. 改変抗体が、単一特異性 (mono-specific) の改変抗体である請求項 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の改変抗体。
- 1 5. 改変抗体が、多価特異性 (multi-specific) の改変抗体である請求項 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の改変抗体。
- 5 1 6. 改変抗体が、二重特異性 (bi-specific) の改変抗体である請求項 1 5 に記載の改変抗体。
- 1 7. L 鎖 V 領域及び H 鎖 V 領域が、同一のモノクローナル抗体由来である、請求項 1 4 に記載の改変抗体。
- 1 8. 親抗体と比較して同等以上のアゴニスト作用 (ED50 値) を示す、請求項 1 10 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載の改変抗体。
- 1 9. 親抗体と比較して 2 倍以上のアゴニスト作用 (ED50 値) を示す、請求項 1 8 に記載の改変抗体。
- 2 0. 親抗体と比較して 10 倍以上のアゴニスト作用 (ED50 値) を示す、請求項 1 9 に記載の改変抗体。
- 15 2 1. 親抗体がアゴニスト作用を実質的に有さない、請求項 1 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載の改変抗体。
- 2 2. トロンボポエチン (TPO) と比較して同等以上の TPO アゴニスト作用 (ED50 値) を示す、抗体の H 鎖 V 領域を 2 つ以上及び L 鎖 V 領域を 2 つ以上含む化合物。
- 20 2 3. TPO と比較して 2 倍以上の TPO アゴニスト作用 (ED50 値) を示す、請求項 2 2 に記載の化合物。
- 2 4. TPO と比較して 1 0 倍以上の TPO アゴニスト作用 (ED50 値) を示す、請求項 2 3 に記載の化合物。
- 2 5. TPO アゴニスト作用の ED50 値が 2 0 p M 以下である請求項 1 ～ 2 4 のいずれか 1 項に記載の改変抗体または化合物。
- 25 2 6. TPO アゴニスト作用の ED50 値が約 1 0 p M 以下である請求項 2 5 に記載の改変抗体または化合物。
- 2 7. TPO アゴニスト作用の ED50 値が約 2 p M 以下である請求項 2 6 に記載の

改変抗体または化合物。

28. 親抗体と比較して、1/10以下の細胞間接着作用（ED50 値）を示す請求項1～27のいずれか1項に記載の改変抗体または化合物。

5 29. 細胞間接着作用を実質的に有さない請求項1～27のいずれか1項に記載の改変抗体または化合物。

30. 請求項1～29のいずれか1項に記載の改変抗体または化合物をコードするDNA。

31. 請求項1～29のいずれか1項に記載の改変抗体または化合物を産生する動物細胞。

10 32. 請求項1～29のいずれか1項に記載の改変抗体または化合物を産生する微生物。

33. 請求項1～29のいずれか1項に記載の改変抗体または化合物のTPOアゴニストとしての使用。

15 34. 請求項1～29のいずれか1項に記載の改変抗体または化合物を用いてTPOレセプターを架橋することにより細胞内にシグナル伝達を起し、該細胞にアゴニスト作用を生じさせる方法。

35. TPOアゴニスト作用が、巨核球の増殖、分化誘導または成長の刺激、血小板の産生またはTPOレセプタータンパク質のリン酸化である請求項34記載の方法。

20 36. 請求項1～29のいずれか1項に記載の改変抗体または化合物を有効成分として含む医薬。

37. 医薬が、血小板減少症の治療剤である請求項36記載の医薬。

38. 請求項1～29のいずれか1項に記載の改変抗体または化合物の医薬としての使用。

25 39. TPOレセプターを架橋することによりアゴニスト作用を示す、抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む改変抗体のスクリーニング方法であって、

(1) TPOレセプターに特異的に結合する抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL

鎖V領域を2つ以上含む改変抗体を作製し、

(2) TPOレセプターを発現している細胞と該改変抗体とを接触させ、

(3) TPOレセプターを架橋することにより該細胞に生ずるTPOアゴニスト作用を測定する、

5 工程を含むスクリーニング方法。

40. TPOレセプターを架橋することによりTPOアゴニスト作用を示す、抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む改変抗体のTPOアゴニスト活性の測定方法であって、

(1) TPOレセプターに特異的に結合する抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL

10 鎖V領域を2つ以上含む改変抗体を作製し、

(2) TPOレセプターを発現している細胞と該改変抗体とを接触させ、

(3) TPOレセプターを架橋することにより該細胞に生ずるTPOアゴニスト作用を測定する、

工程を含むTPOアゴニスト活性の測定方法。

1/49

図 1

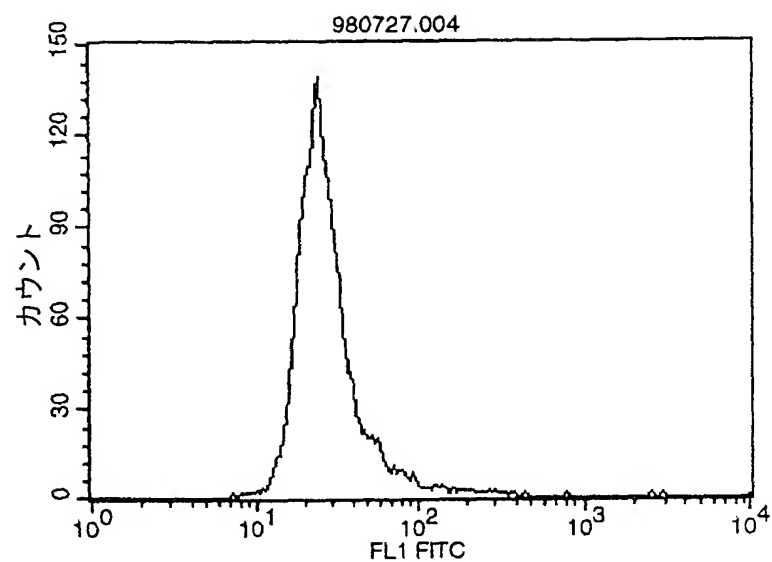
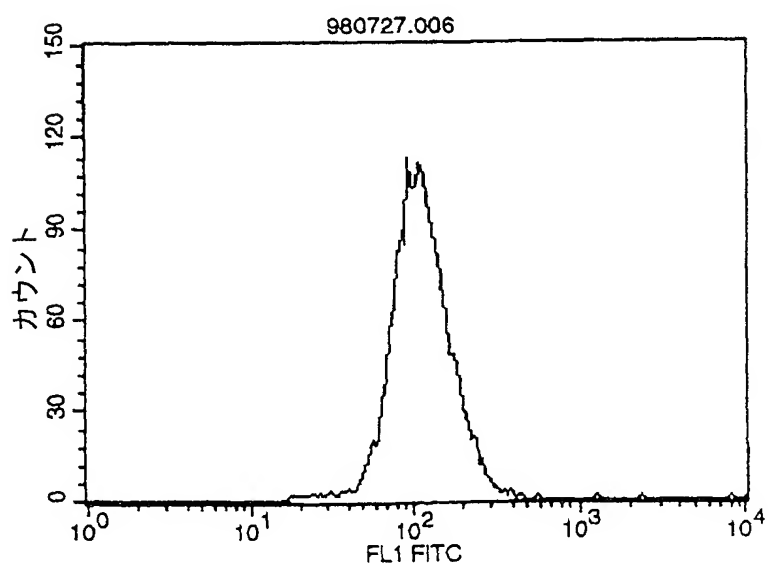


図 2



2/49

図 3

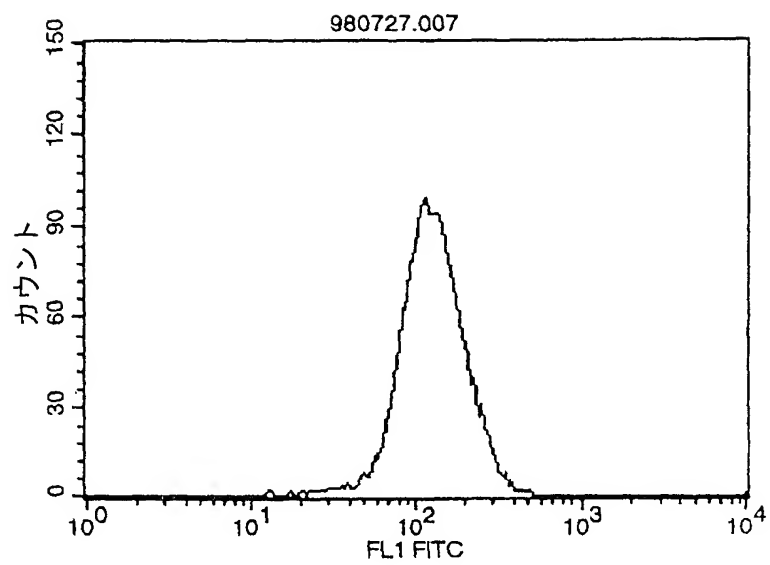


図 4

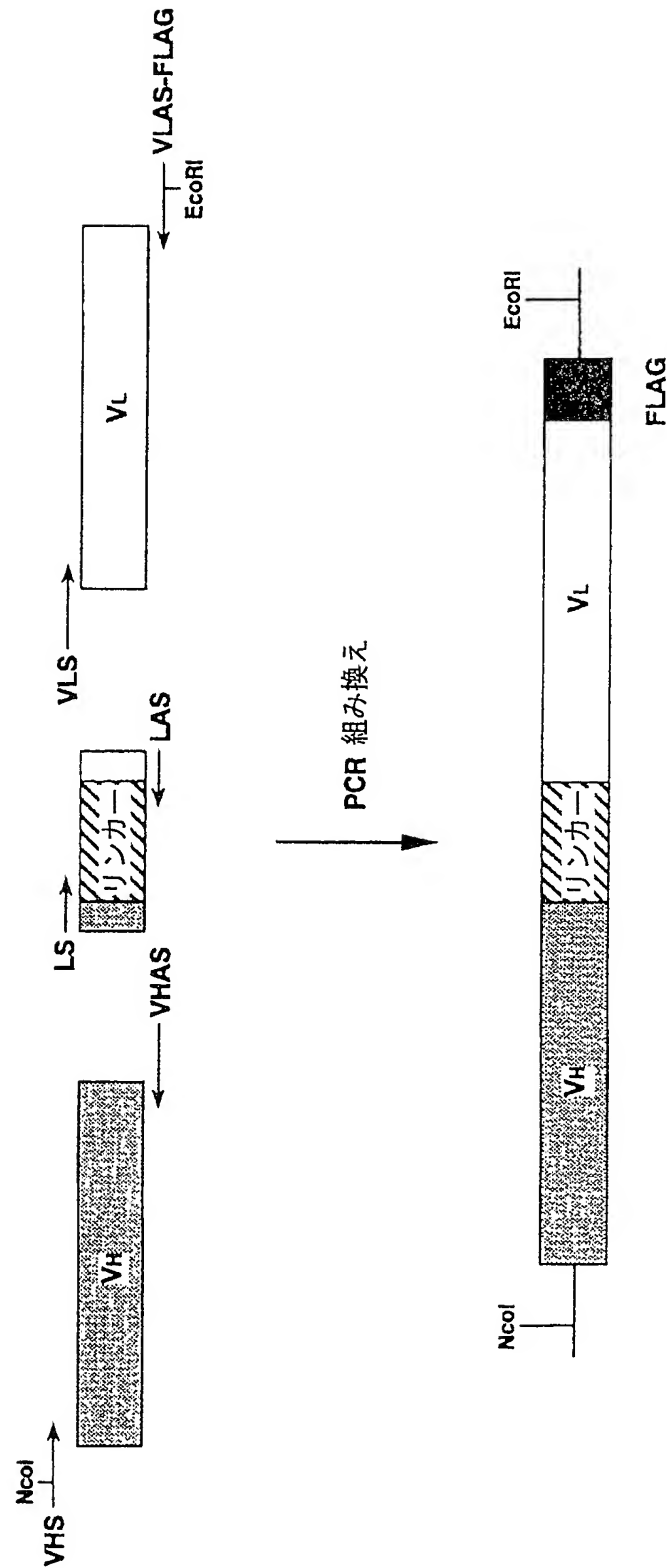


図 5

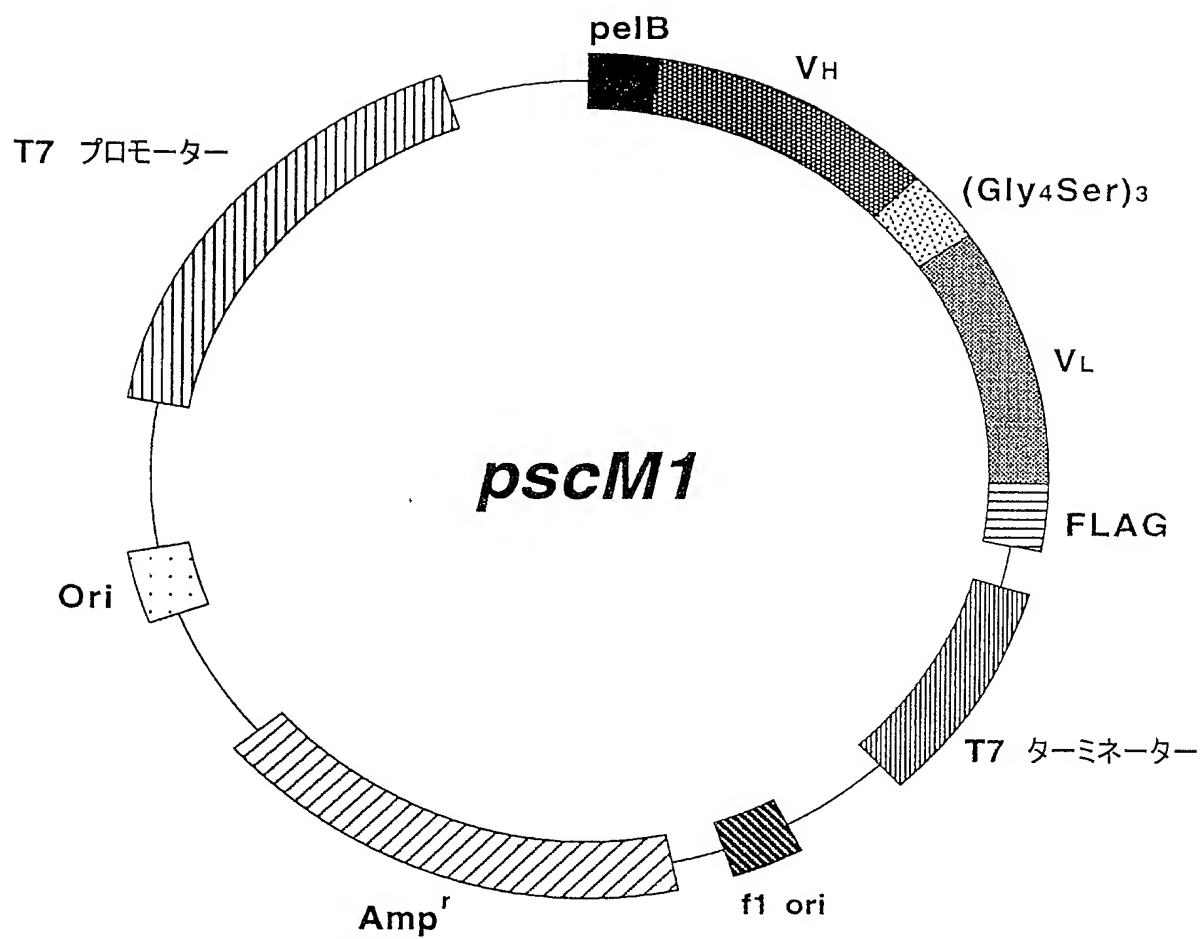


図 6

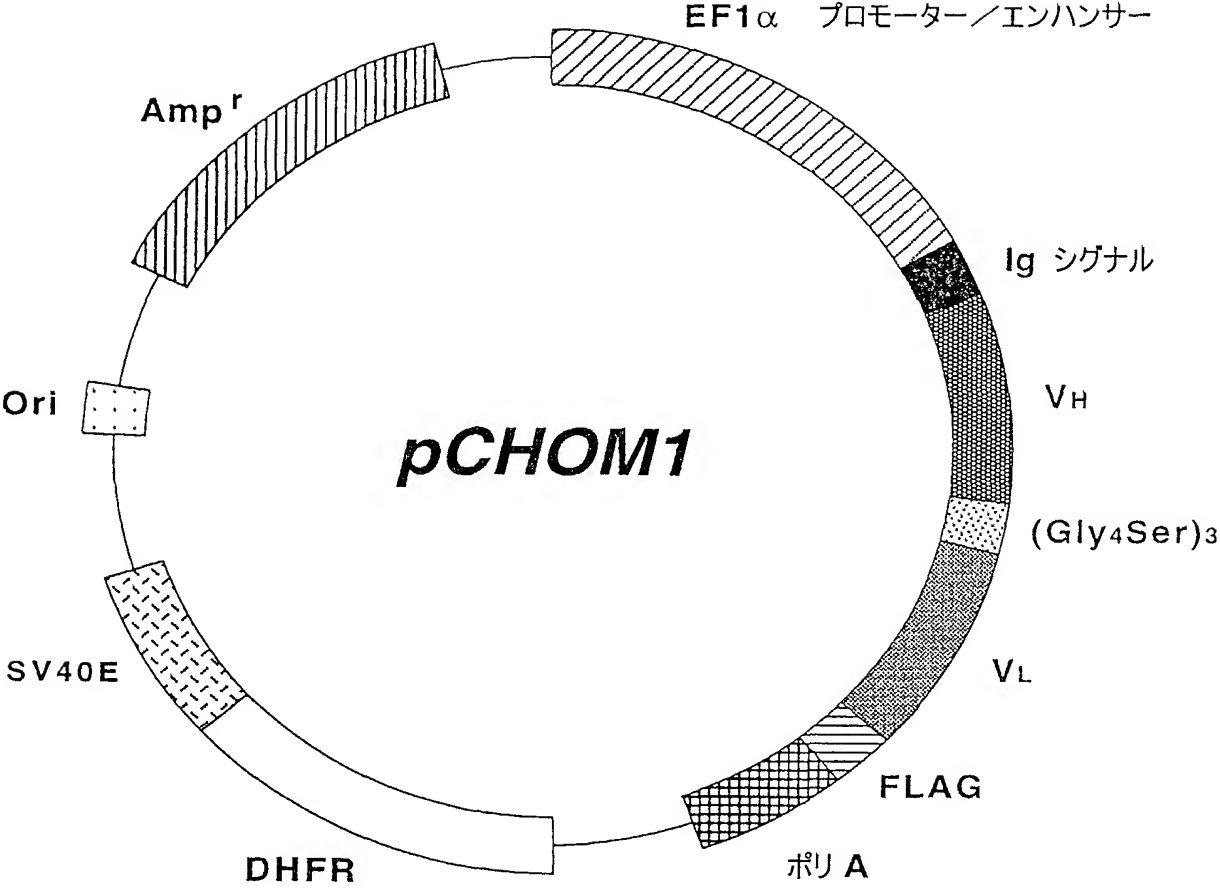


図 7

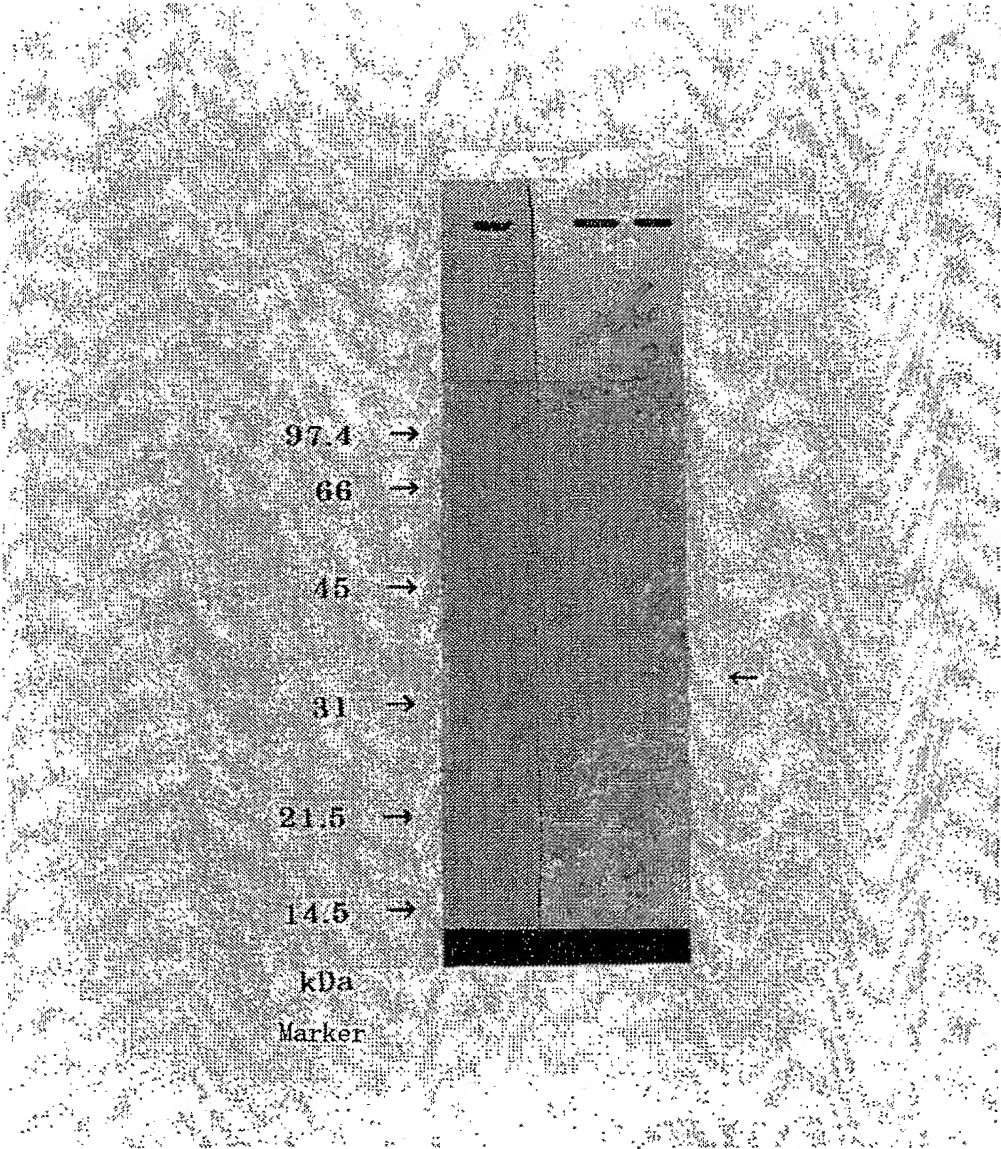


図 8

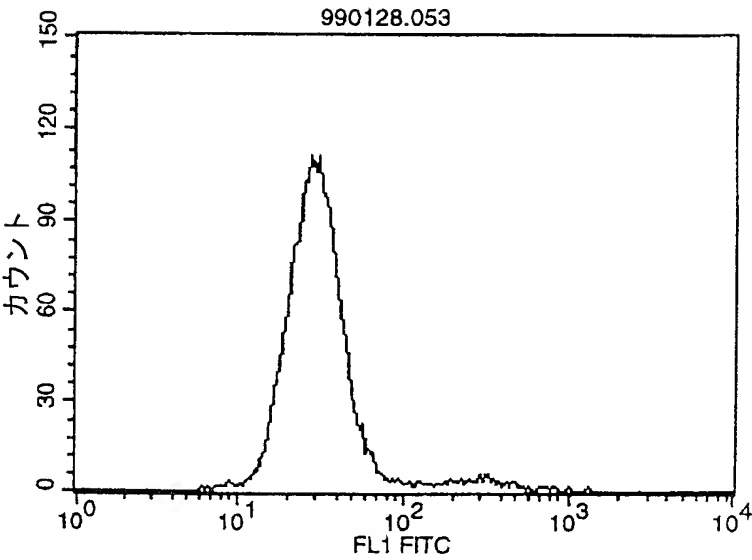
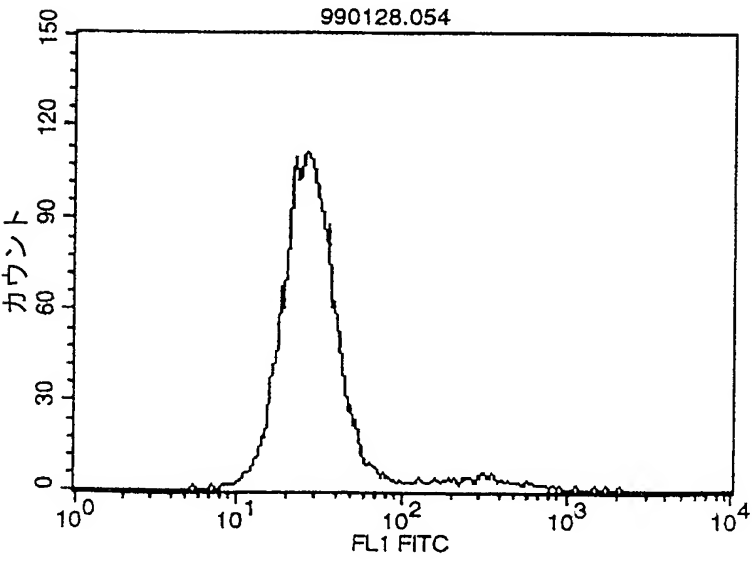


図 9



8/49

図 1 0

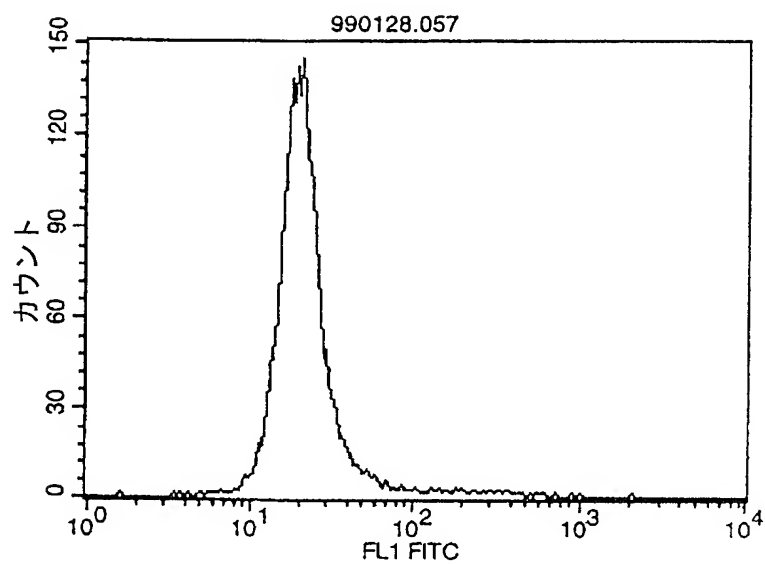


図 1 1

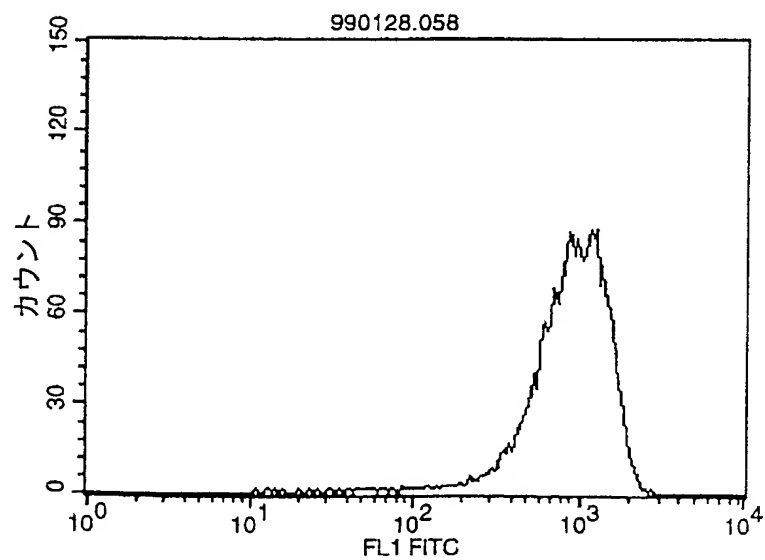


図 1 2

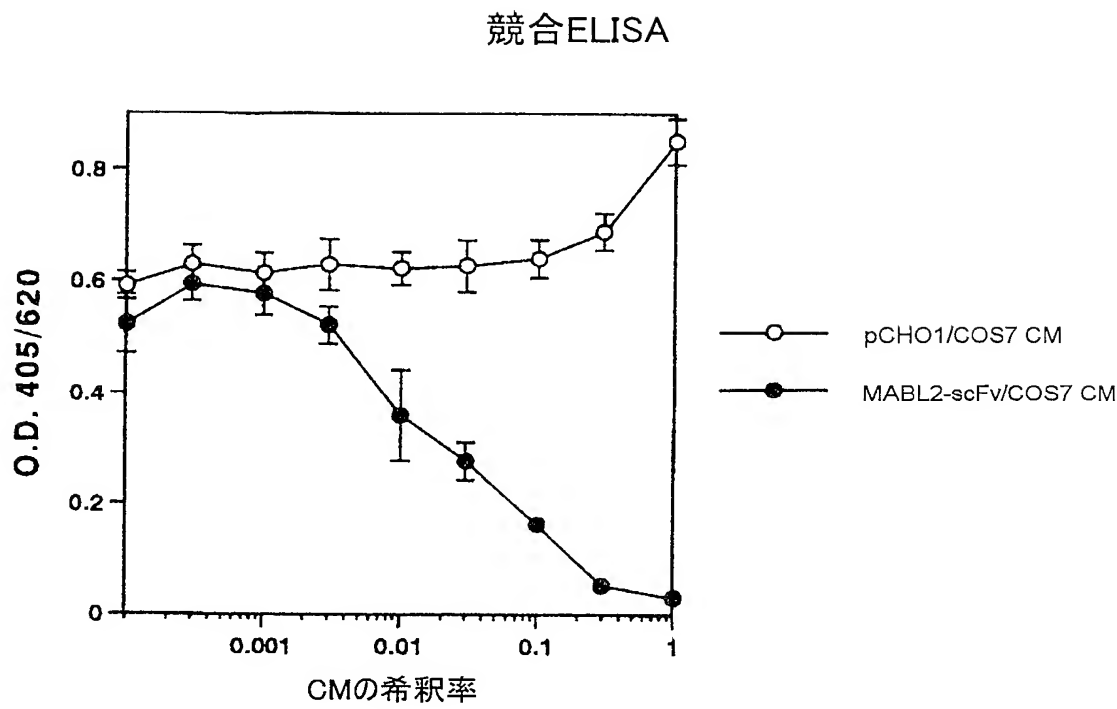


図 1 3

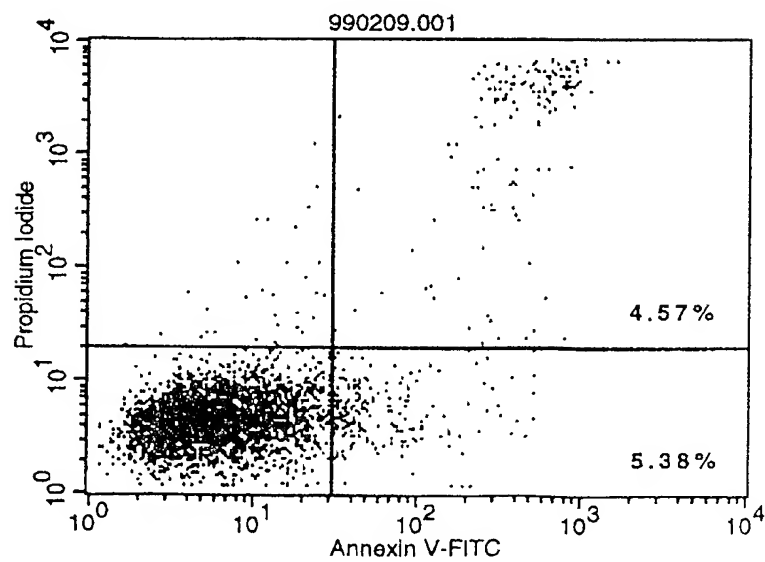


図 1 4

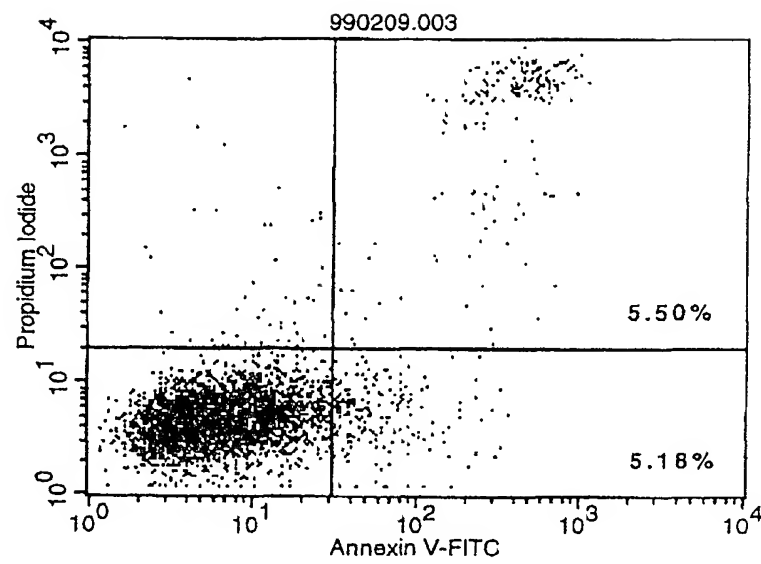


図 1 5

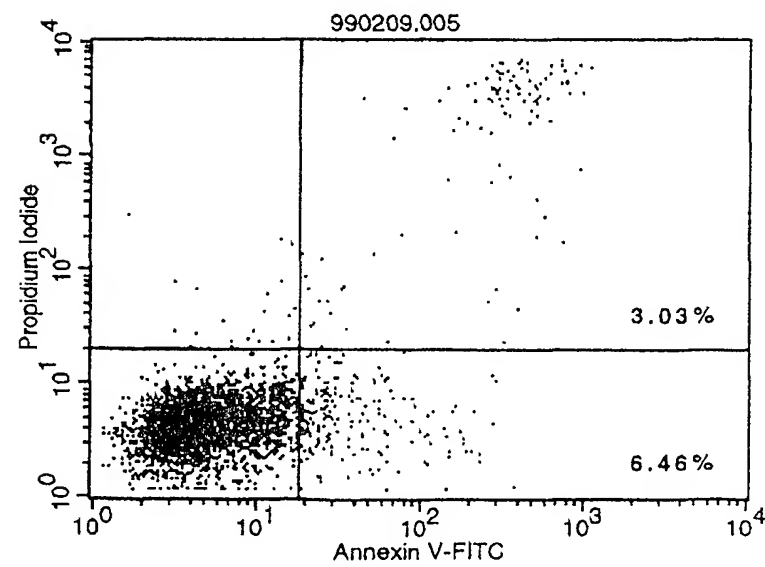


図 1 6

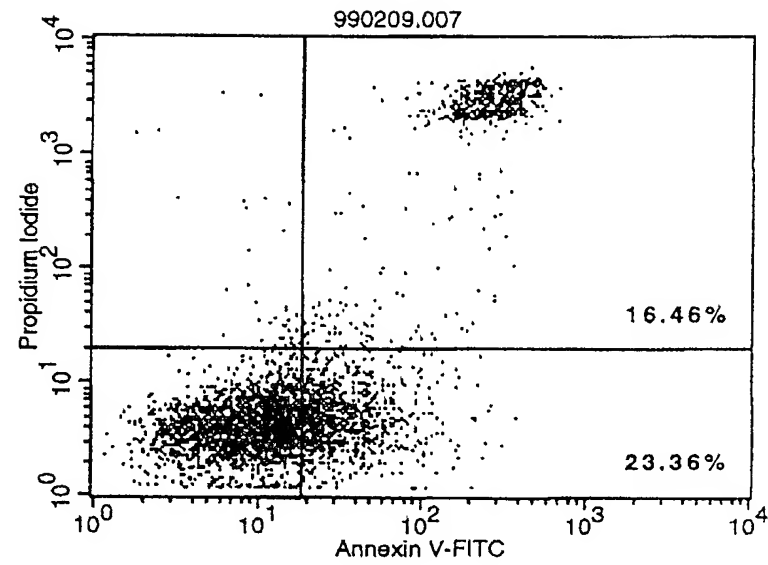


図 1 7

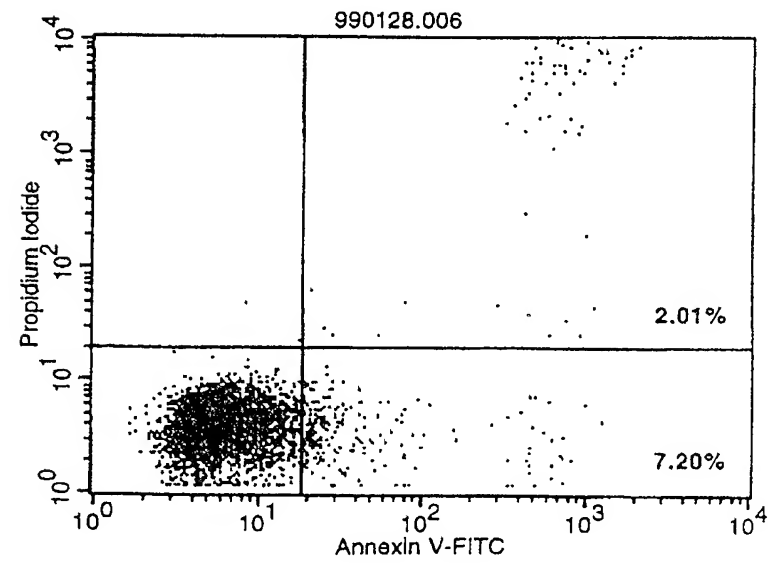
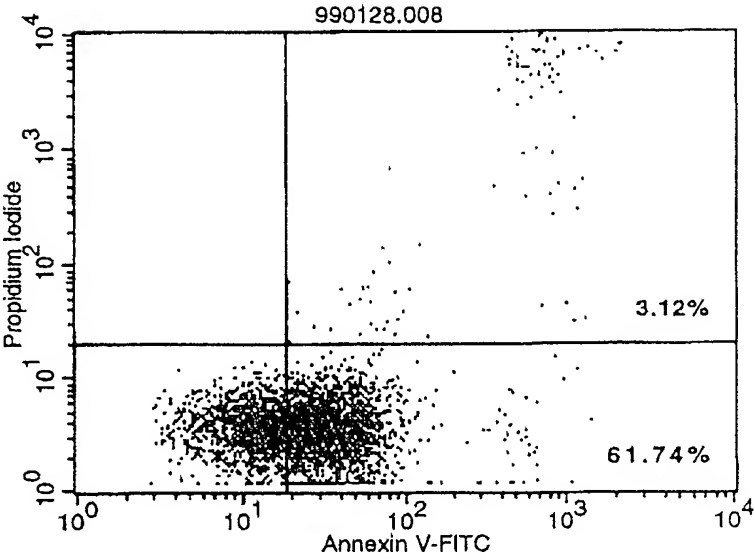
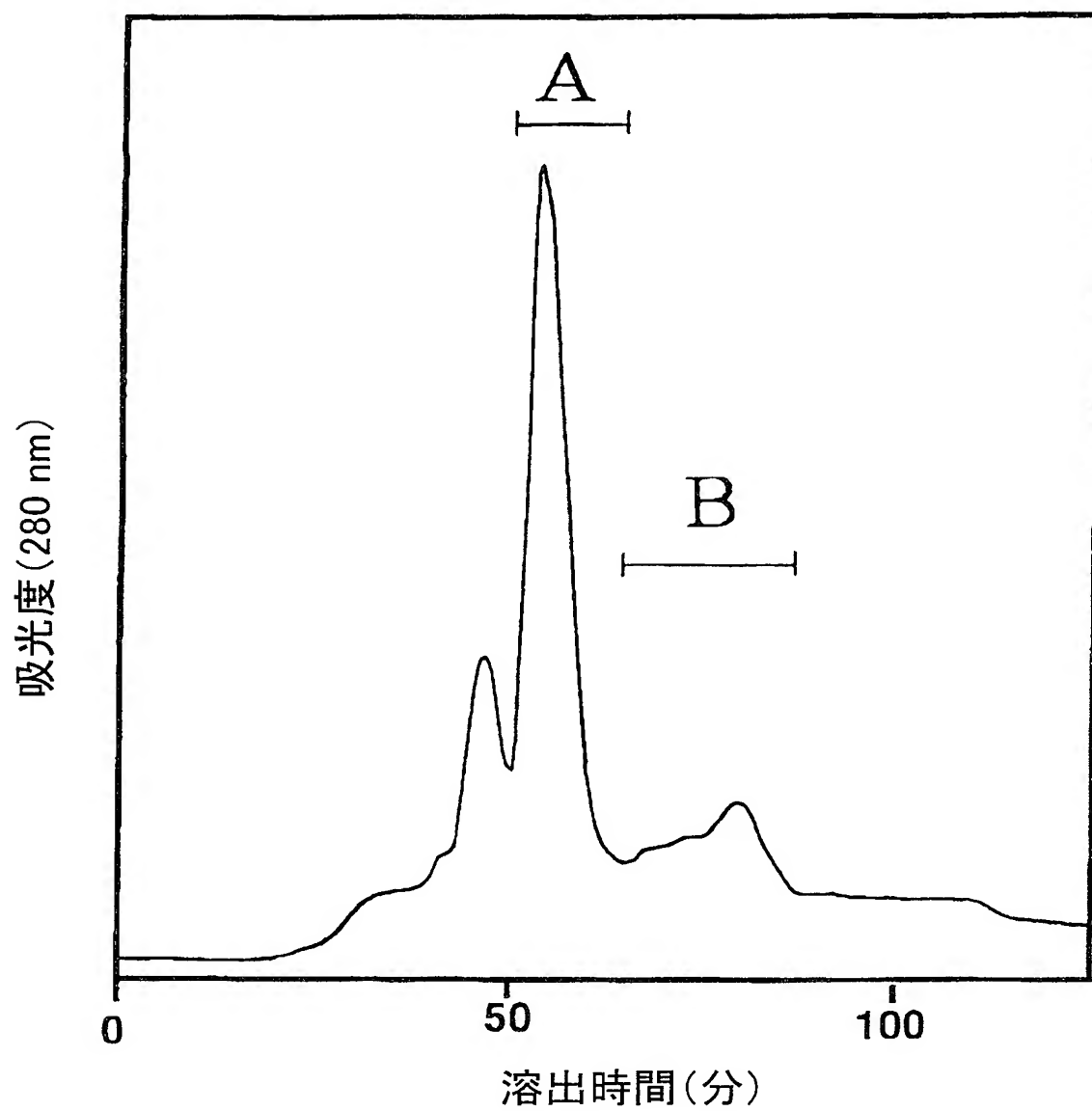


図 18



13/49

図 19



14/49

図 20

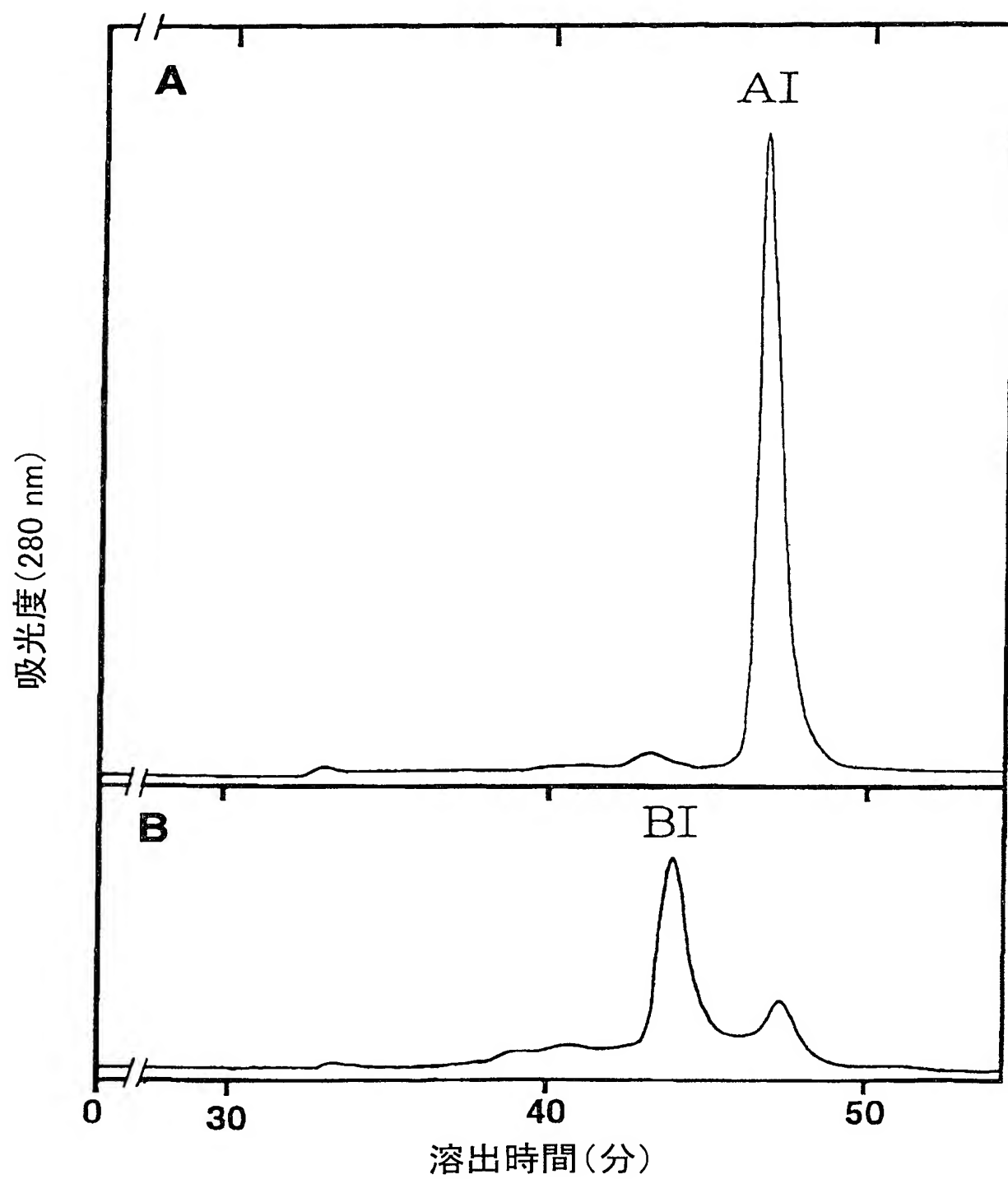
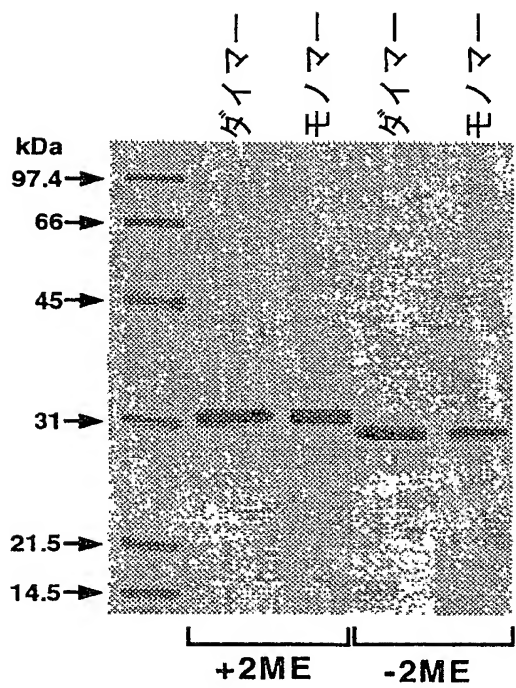


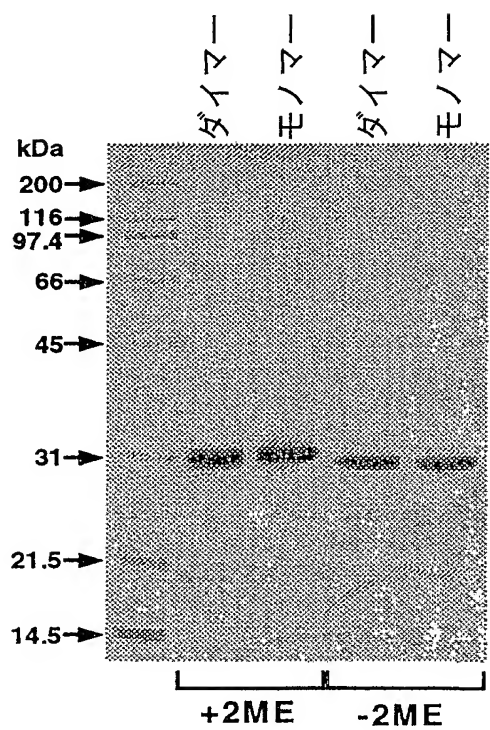
図 2 1

MABL2-scFvのSDS-PAGE分析

<CHO>



<E. coli>

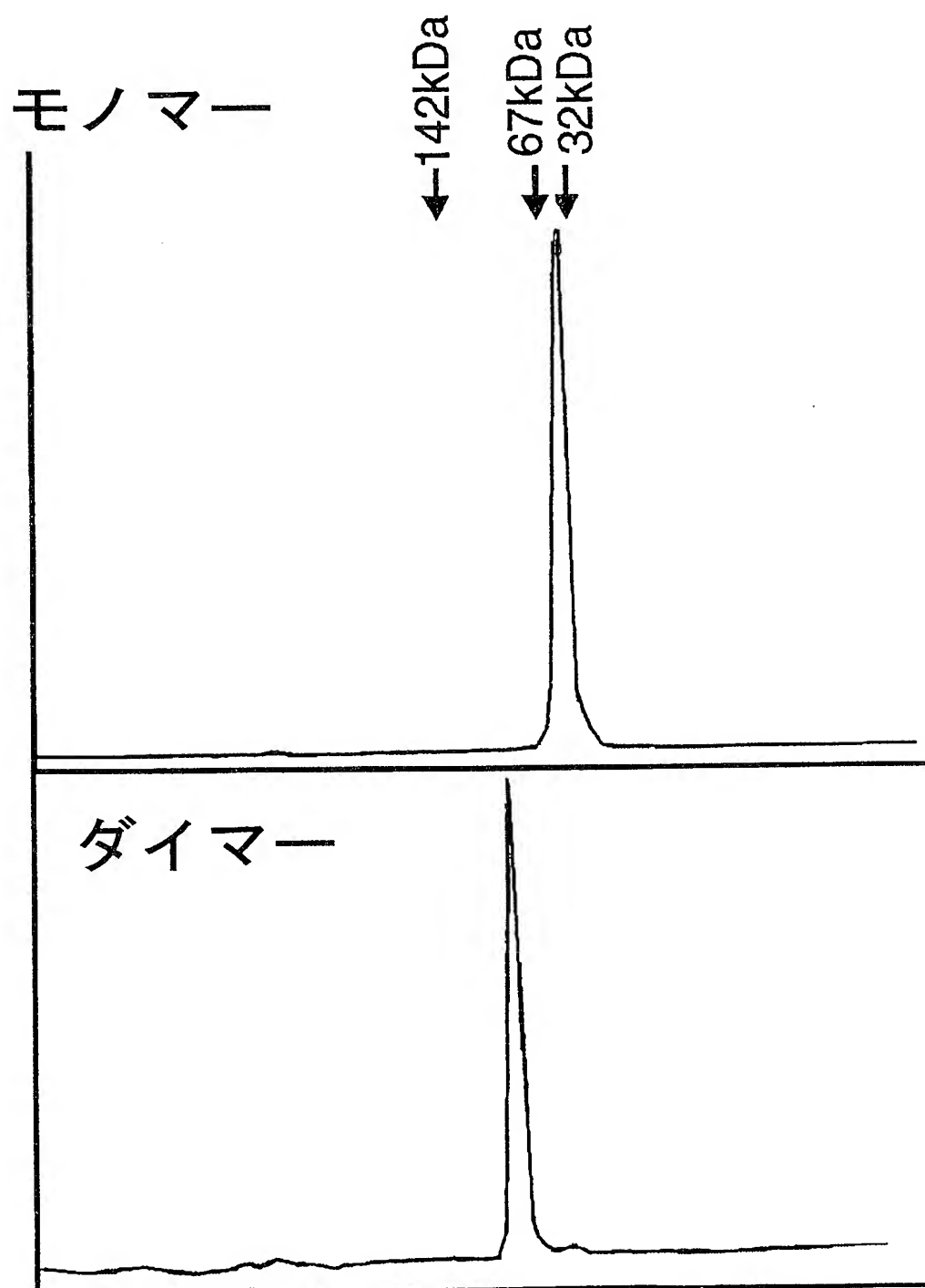


16/49

図 2 2

TSK gel G3000SW

20 mM 酢酸緩衝液, 0.15 M NaCl, pH 6.0



17/49

図 23

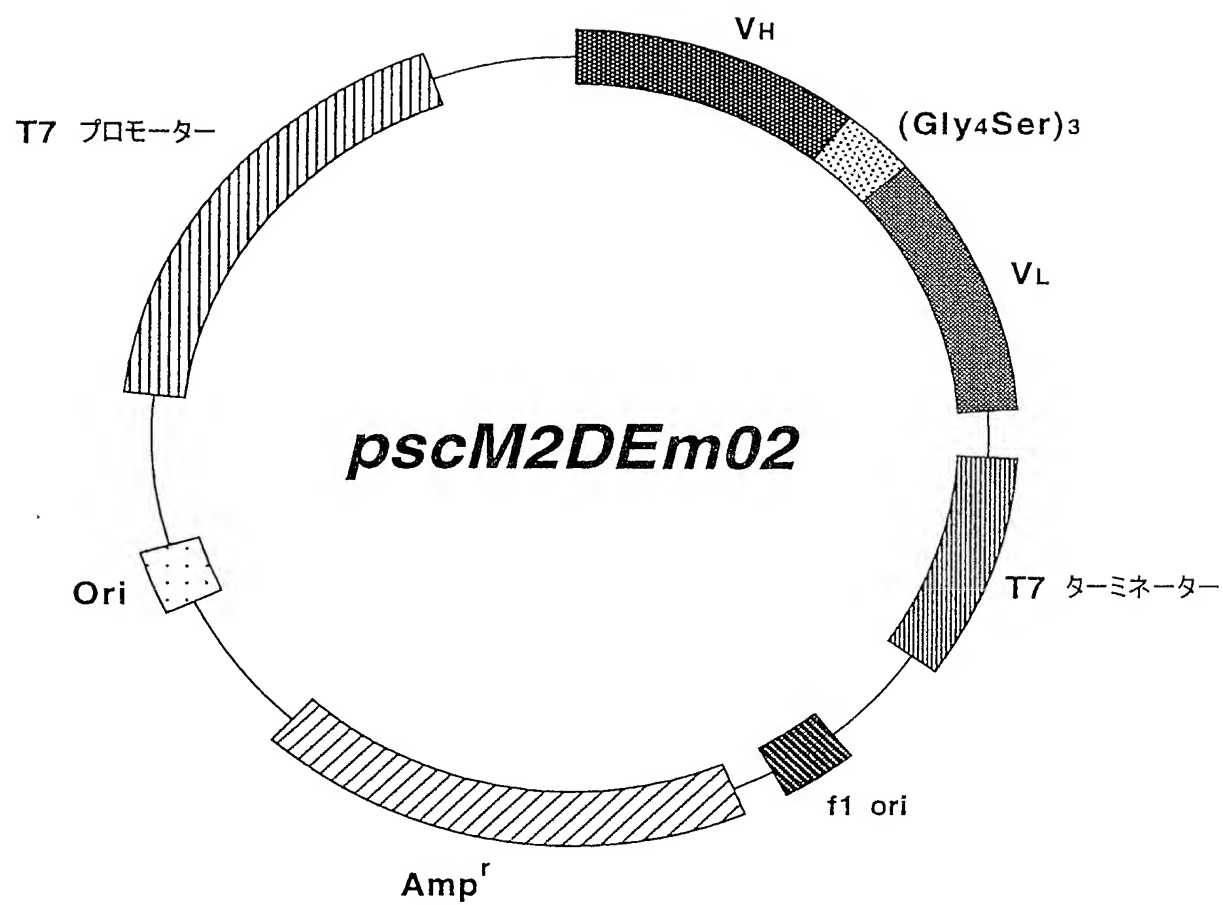
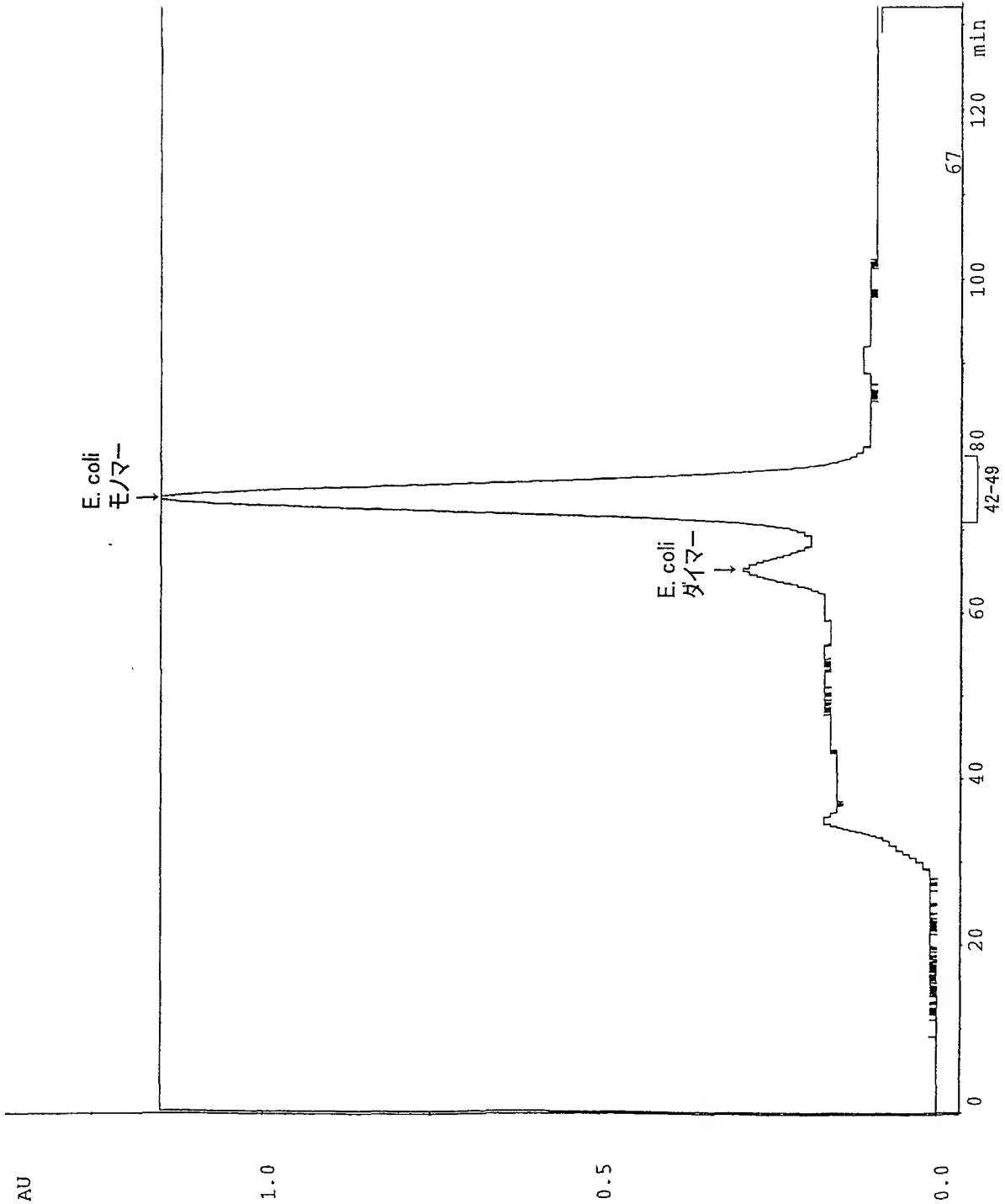
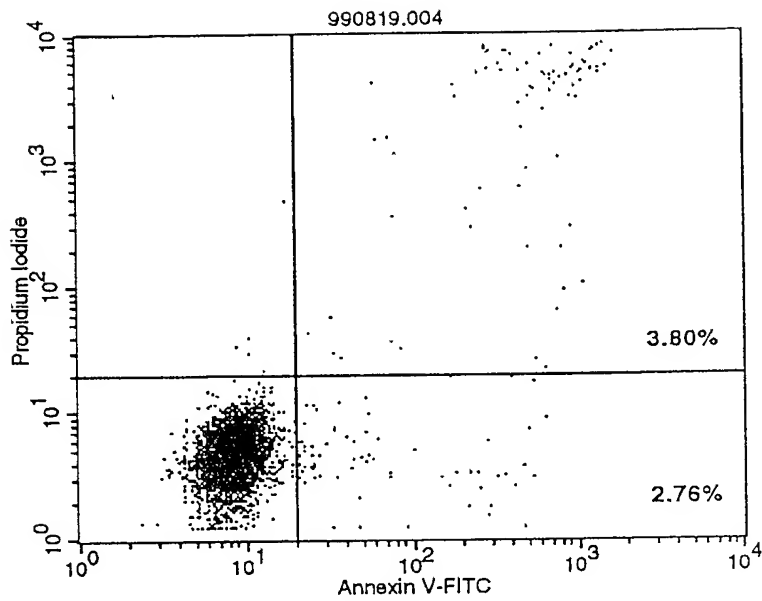


図 2 4



☒ 25



☒ 26

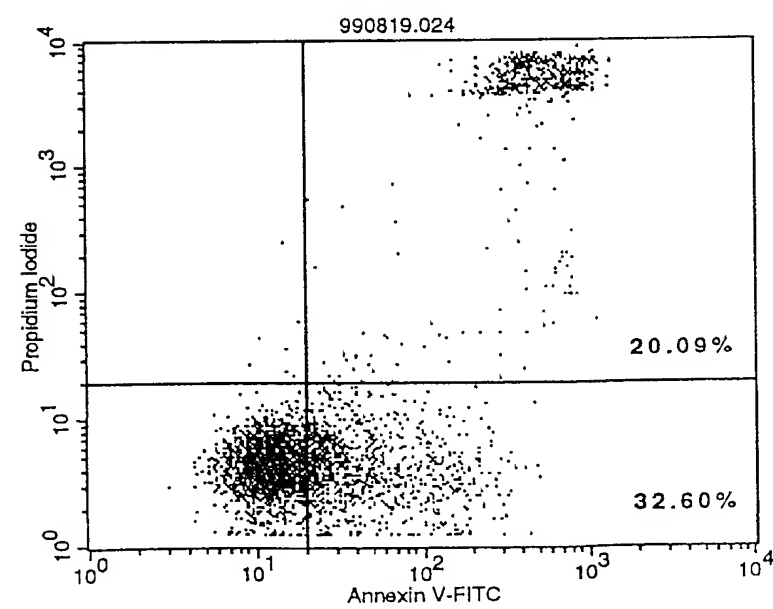


図 27

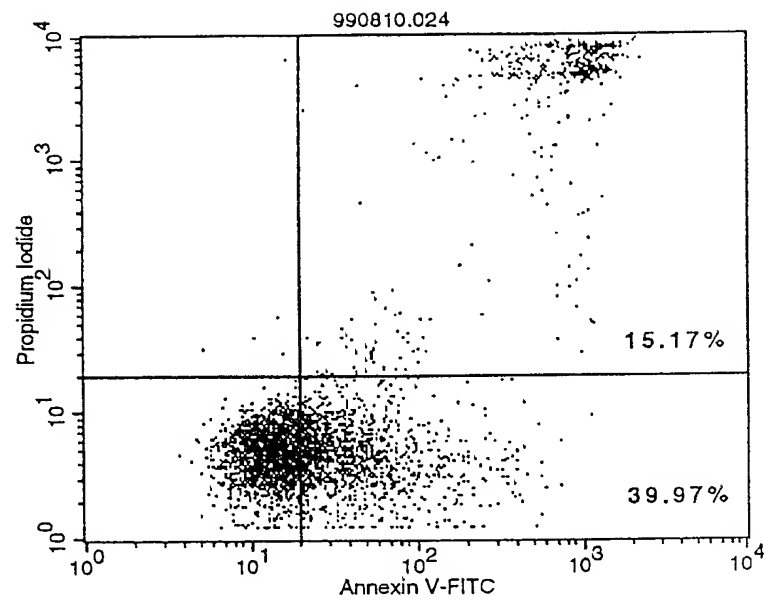
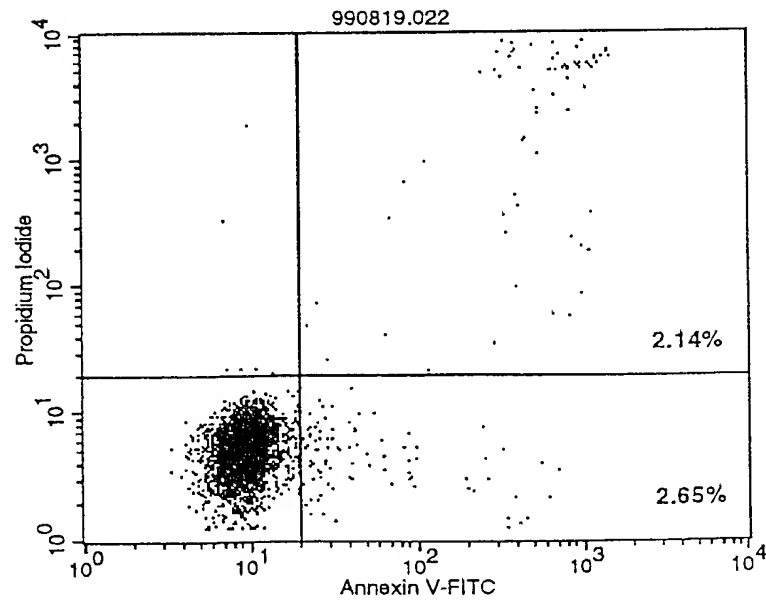
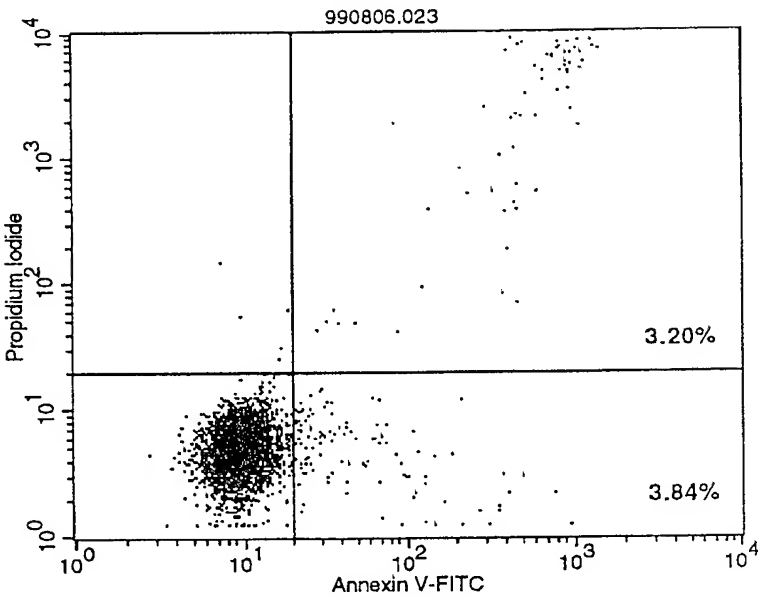


図 28

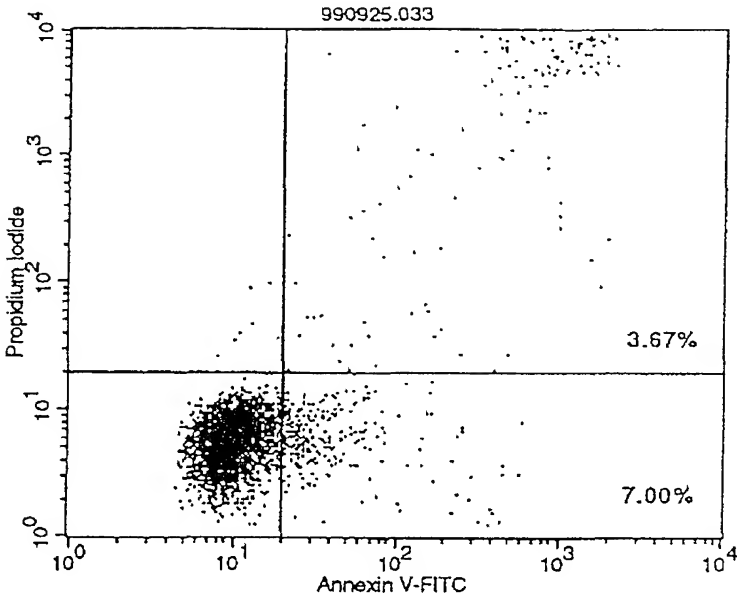


29

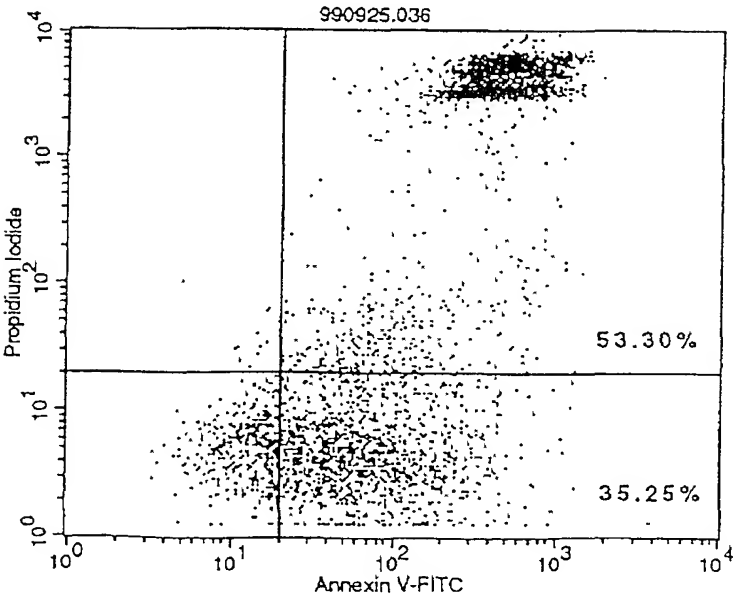


22/49

3 0

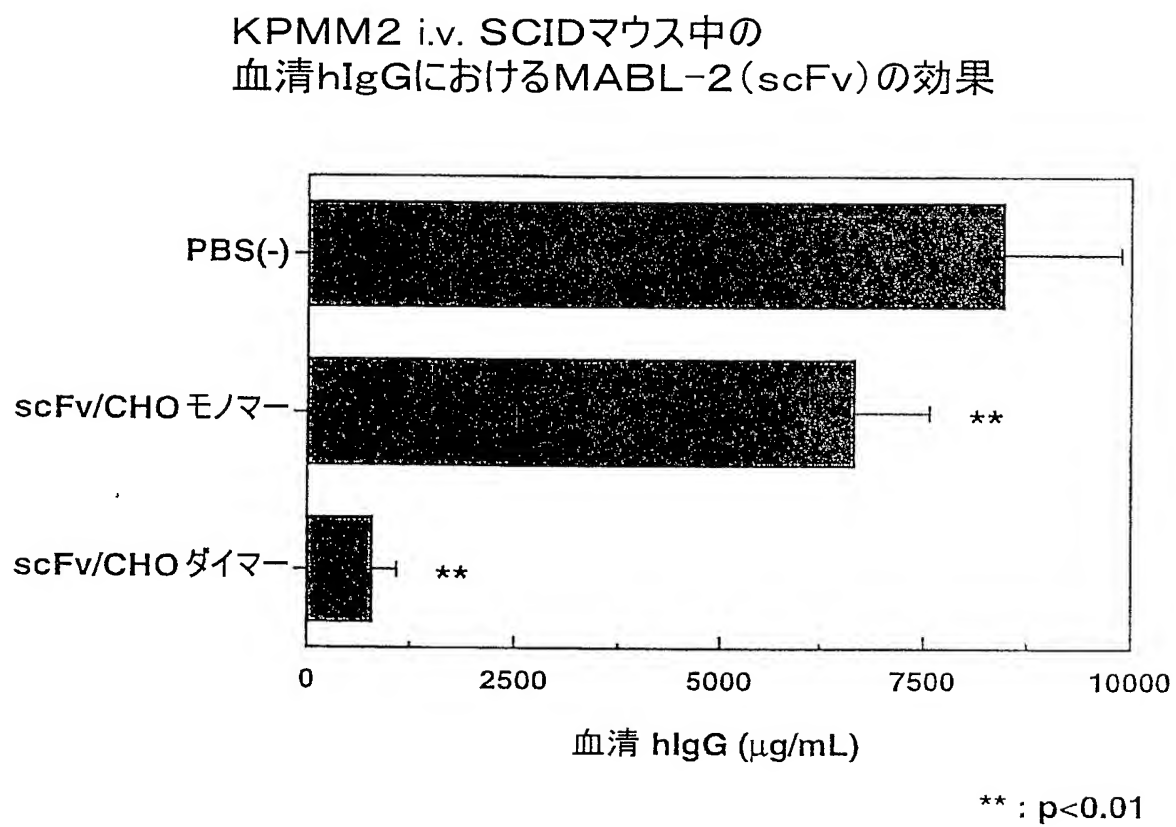


3 1



23/49

図 3 2



24/49

図 3 3

KPMM2 i.v. SCIDマウスの
生存におけるMABL-2(scFv)の効果

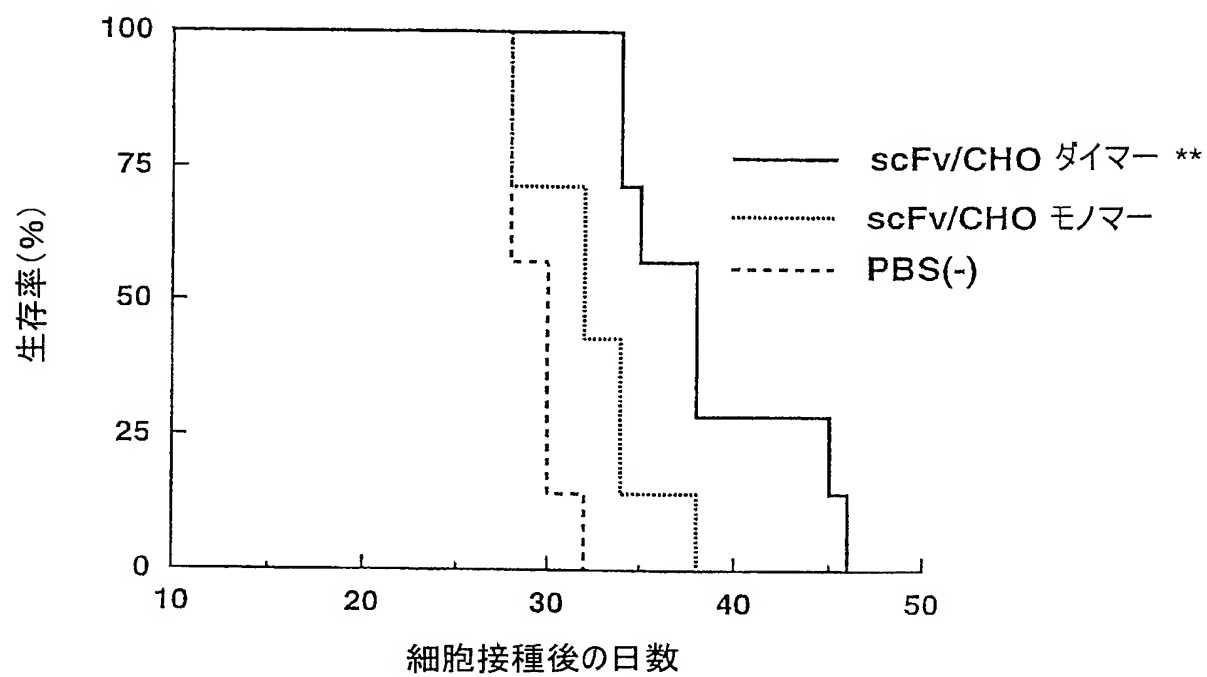
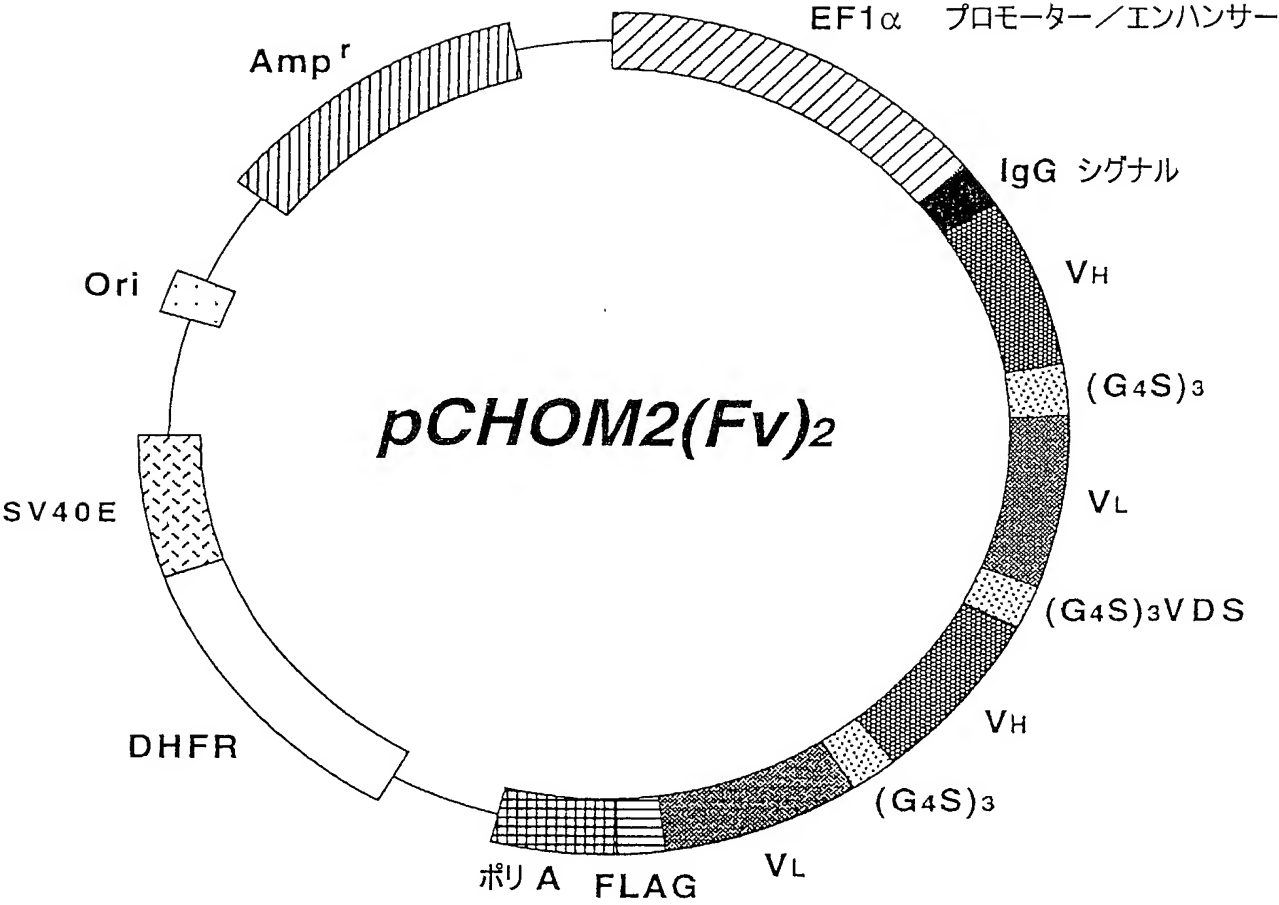
** ; t検定による, $P < 0.01$

図 3 4



26/49

図 3 5

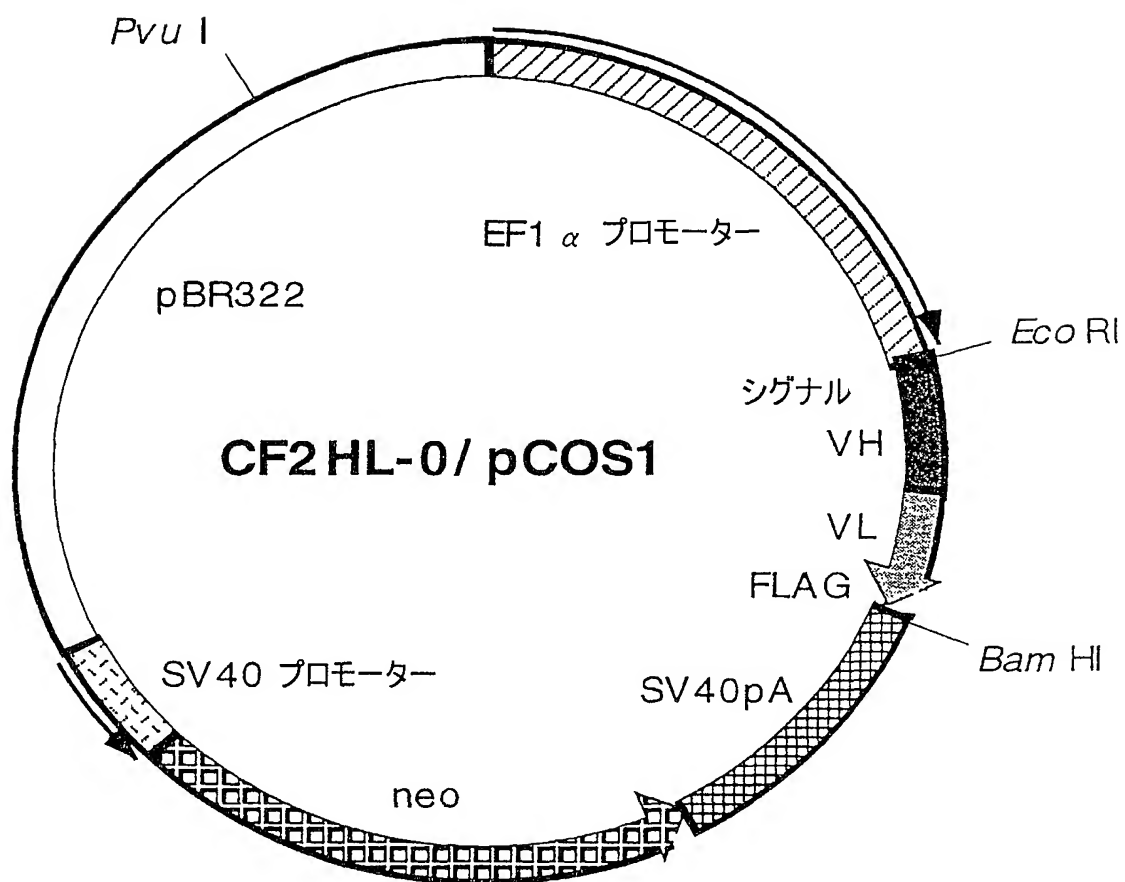


図 3 6

<H L タイプのリンカー塩基配列とアミノ酸配列>

<div>H鎖</div>		<div>L鎖</div>	
… gtc tcg agt		gac gtc gtg …	
V S S		D V V	
		リンカー	
		FLAG	

プラスミド	リンカーアミノ酸の数	リンカー	
CF2HL-0/pCOS1	0	gtc tcg agt	gac gtc gtg
		V S S	D V V
CF2HL-3/pCOS1	3	gtc tcg agt ggt ggt tcc	gac gtc gtg
		V S S G G S	D V V
CF2HL-4/pCOS1	4	gtc tcg agt ggt ggt ggt tcc	gac gtc gtg
		V S S G G G S	D V V
CF2HL-5/pCOS1	5	gtc tcg agt ggt ggt ggt ggt tcc	gac gtc gtg
		V S S G G G G S	D V V
CF2HL-6/pCOS1	6	gtc tcg agt gt ggt ggt ggt ggt tcc	gac gtc gtg
		V S S G G G G G S	D V V
CF2HL-7/pCOS1	7	gtc tcg agt ggt ggt ggt ggt ggt tcc	gac gtc gtg
		V S S G G G G G G S	D V V

図 3 7

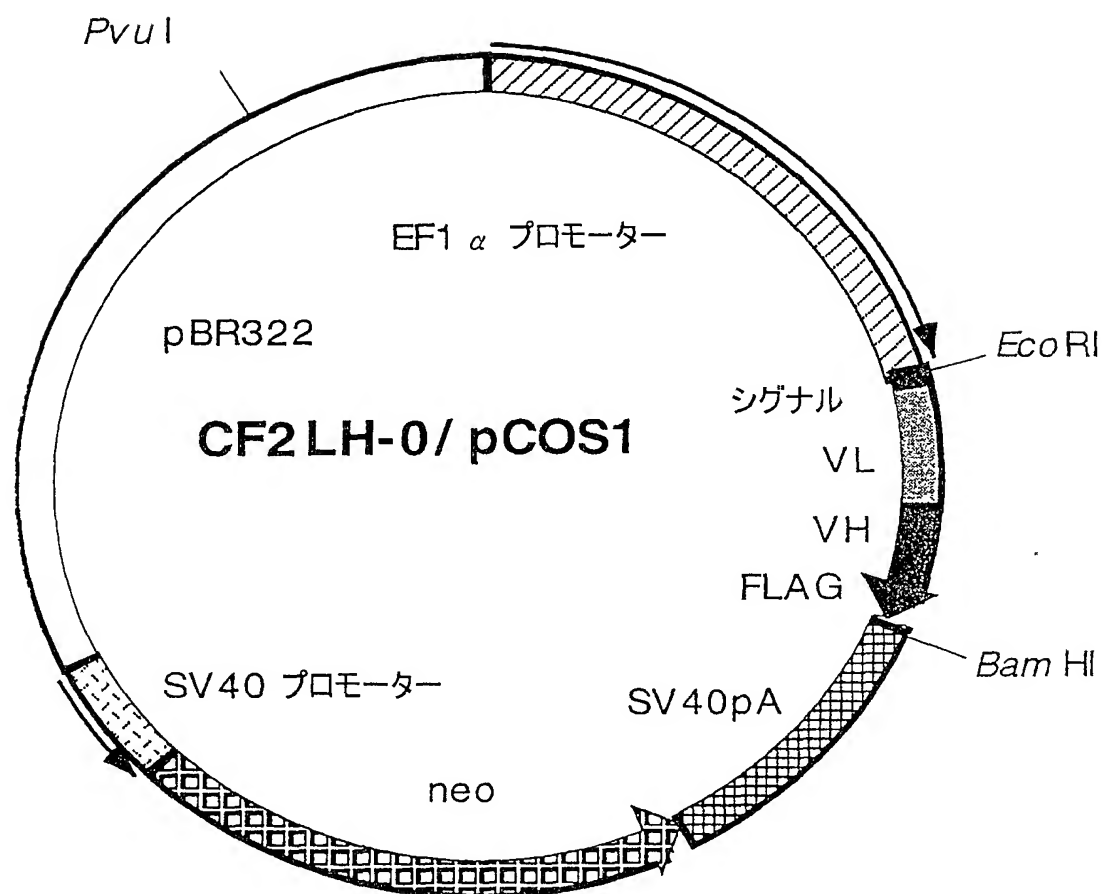
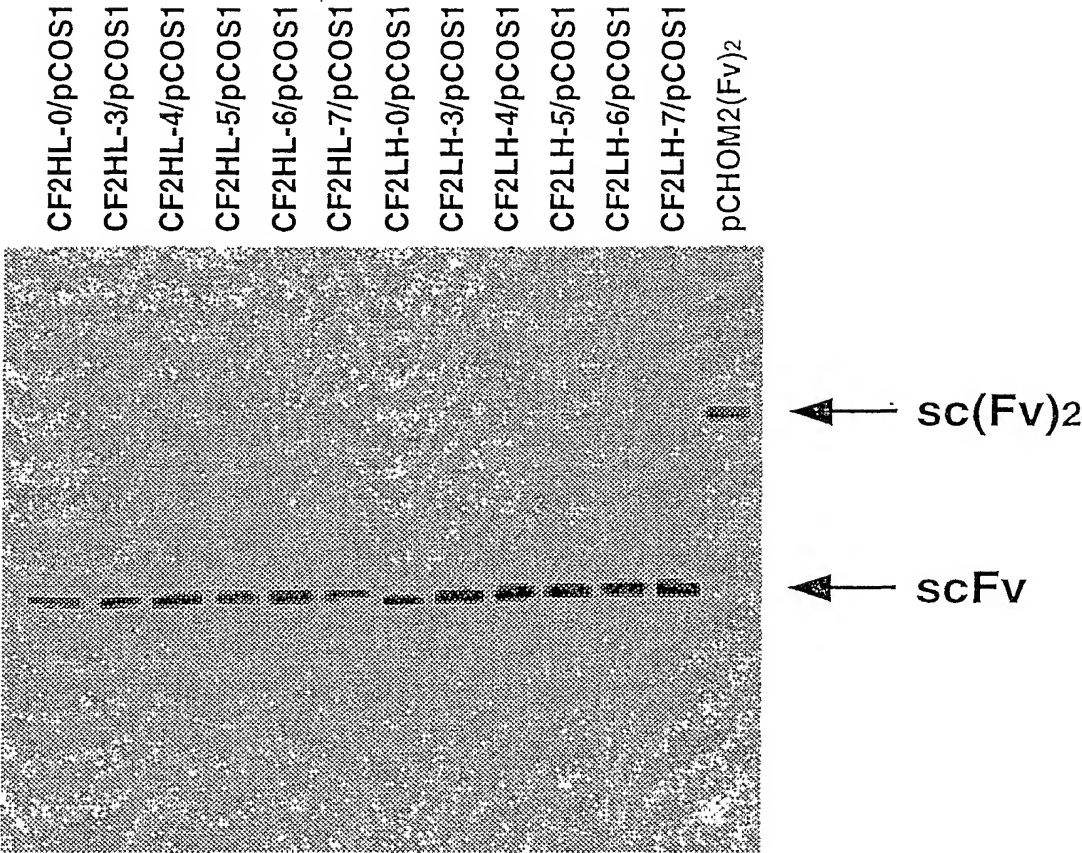


図 3 8

<LHタイプのリンカー塩基配列とアミノ酸配列>

L鎖		H鎖	
… gag ata aaa		リンカー	cag gtc caa …
E I K			FLAG
プラスミド	リンカーアミノ酸の数	リンカー	
CF2LH-0/pCOS1	0	gag ata aaa cag gtc caa	
		E I K Q V Q	
CF2LH-3/pCOS1	3	gag ata aaa tcc gga ggc cag gtc caa	
		E I K S G G Q V Q	
CF2LH-4/pCOS1	4	gag ata aaa tcc gga ggt ggc cag gtc caa	
		E I K S G G G Q V Q	
CF2LH-5/pCOS1	5	gag ata aaa tcc gga ggt ggt ggc cag gtc caa	
		E I K S G G G G Q V Q	
CF2LH-6/pCOS1	6	gag ata aaa tcc gga ggt ggt ggt ggc cag gtc caa	
		E I K S G G G G G Q V Q	
CF2LH-7/pCOS1	7	gag ata aaa tcc gga ggt ggt ggt ggt ggc cag gtc caa	
		E I K S G G G G G G Q V Q	

39



31/49

図 4 O a

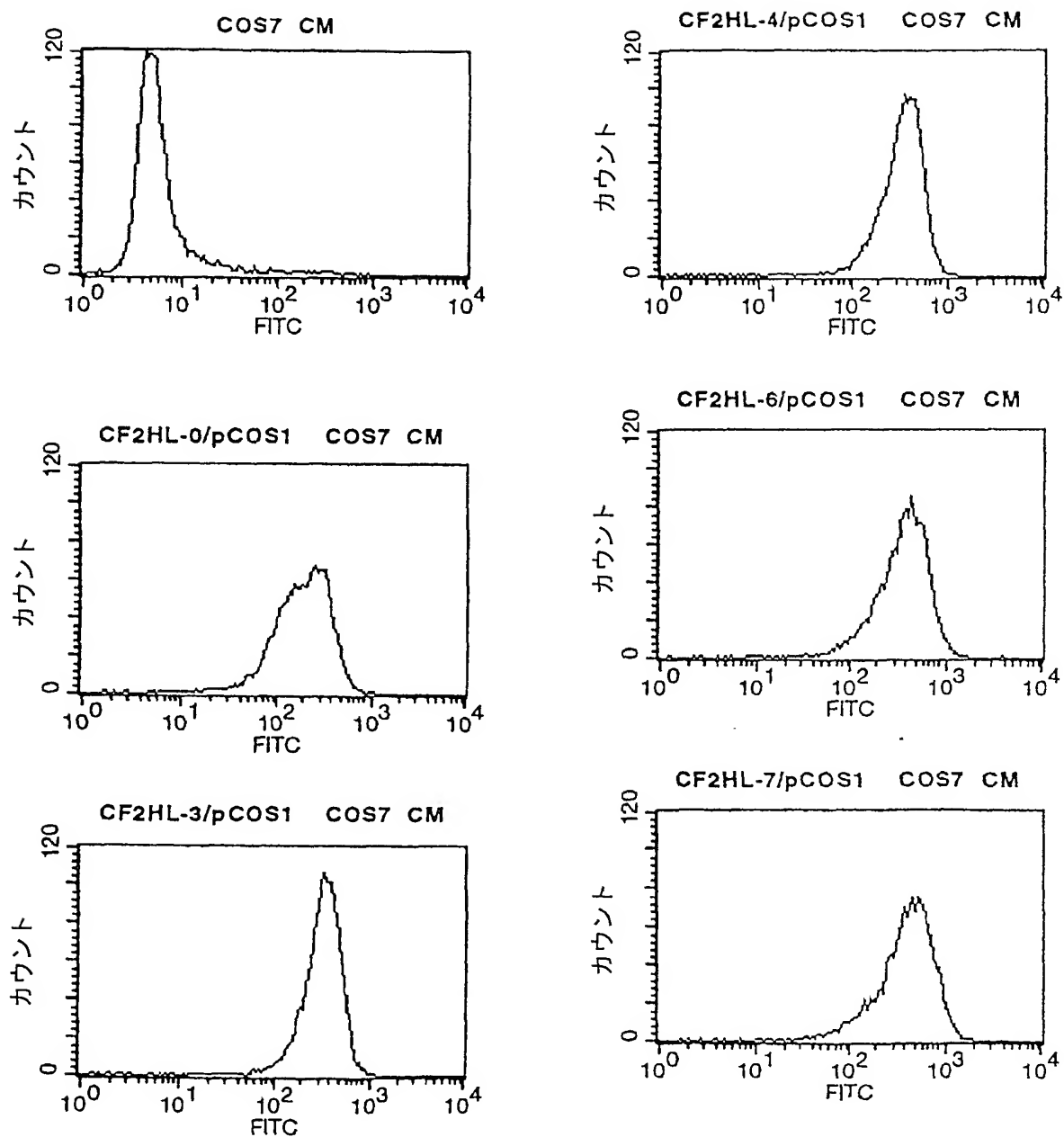


図 40 b

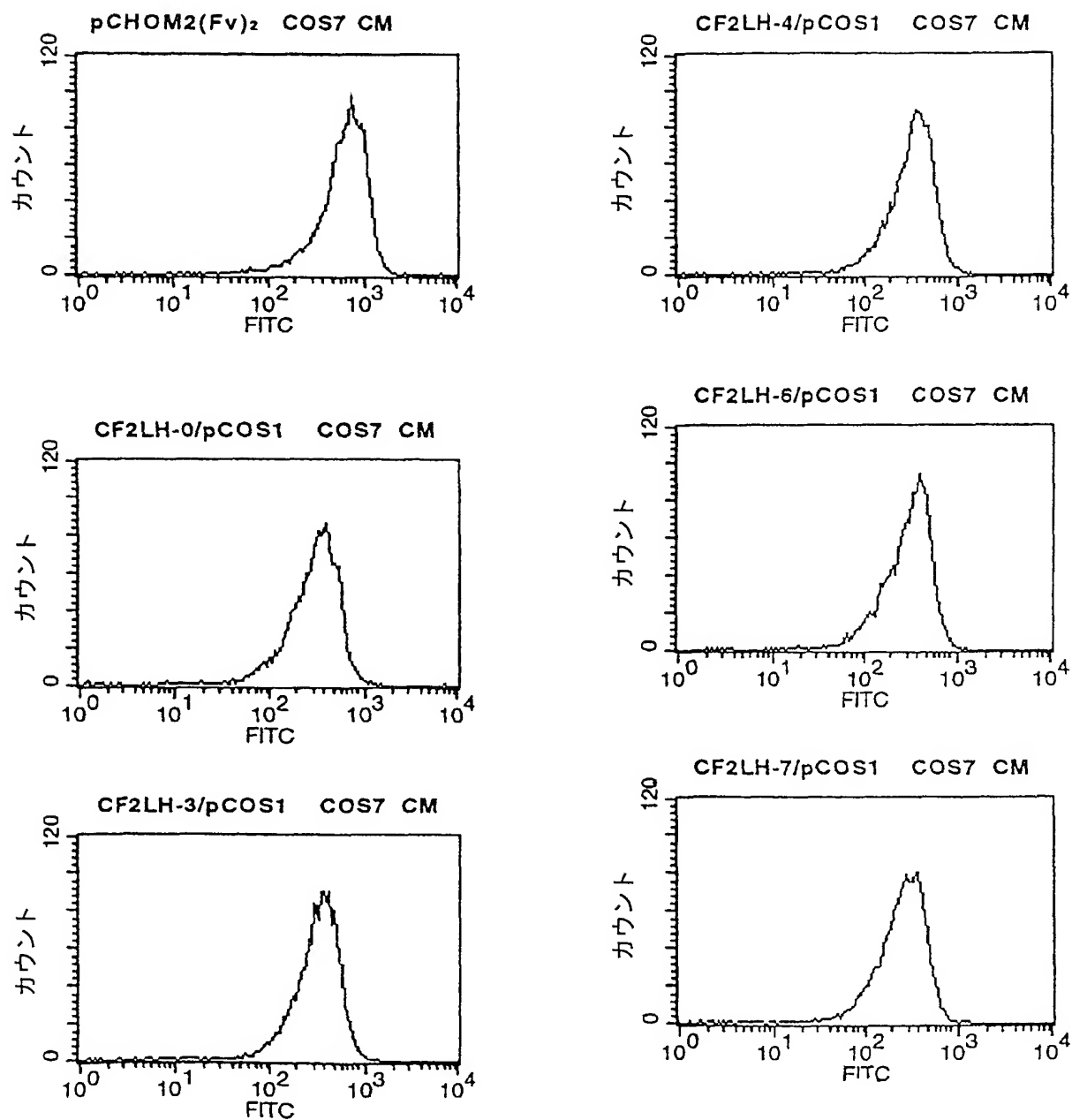
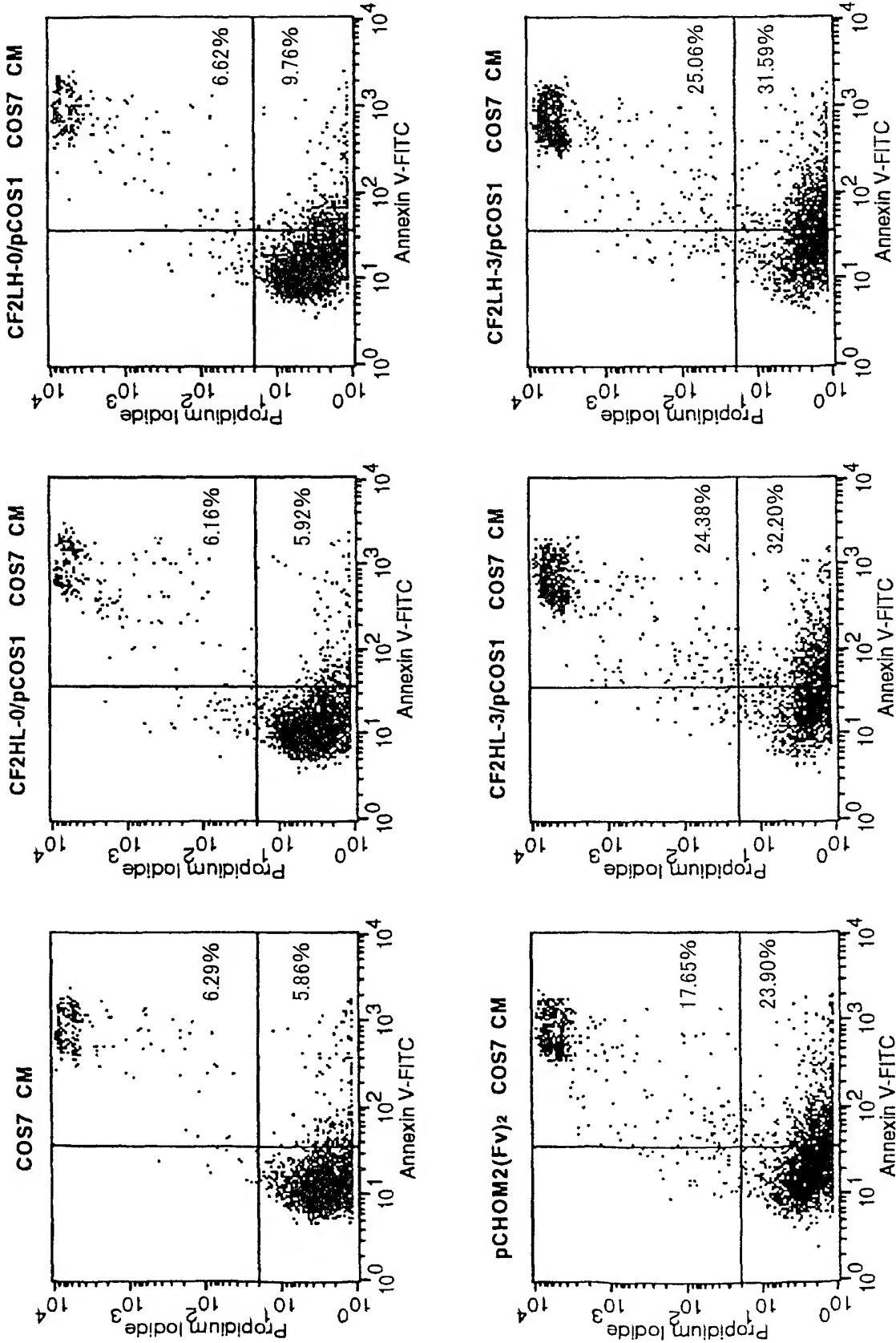


図 4 1 a



33/1/49

図 4 1 b

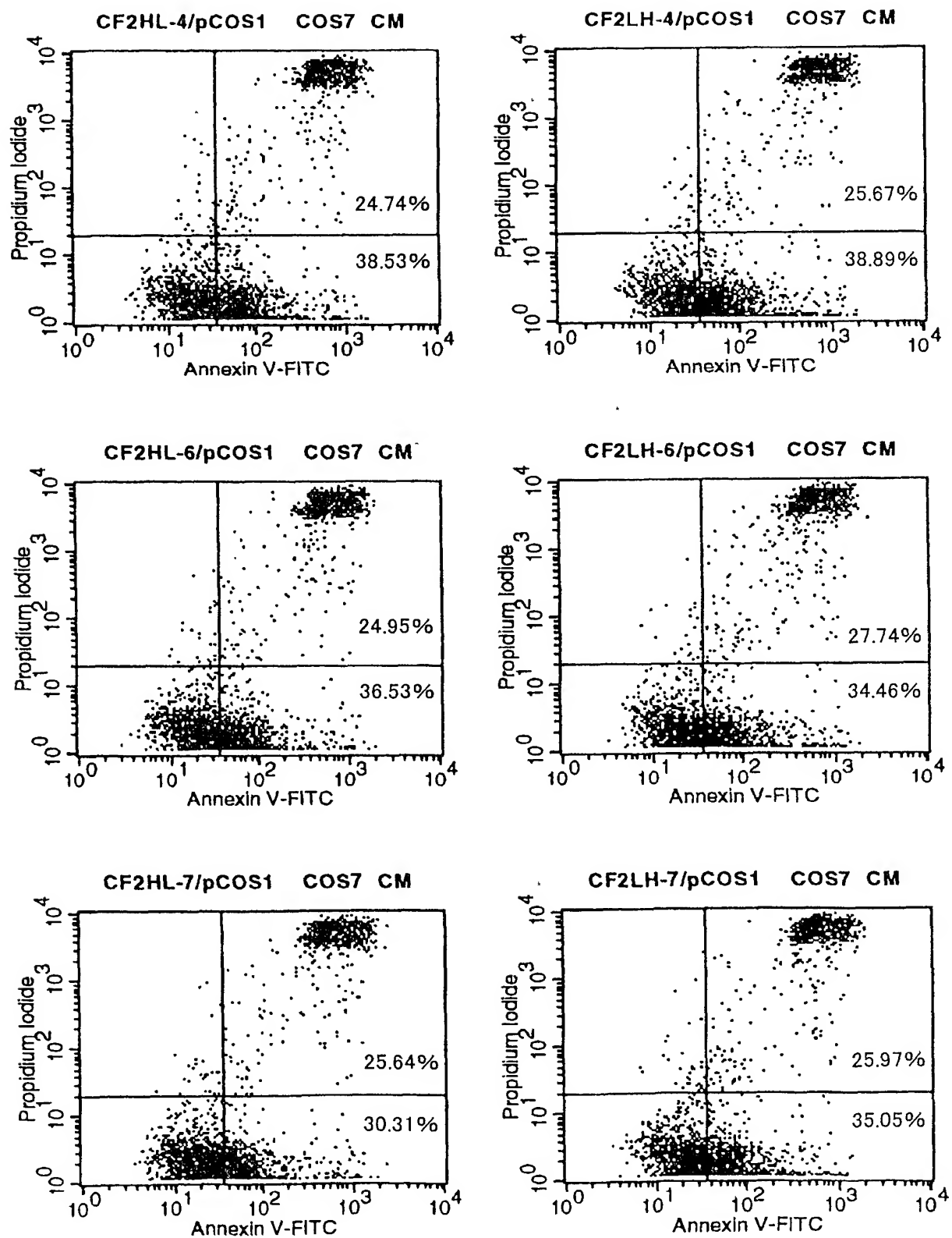
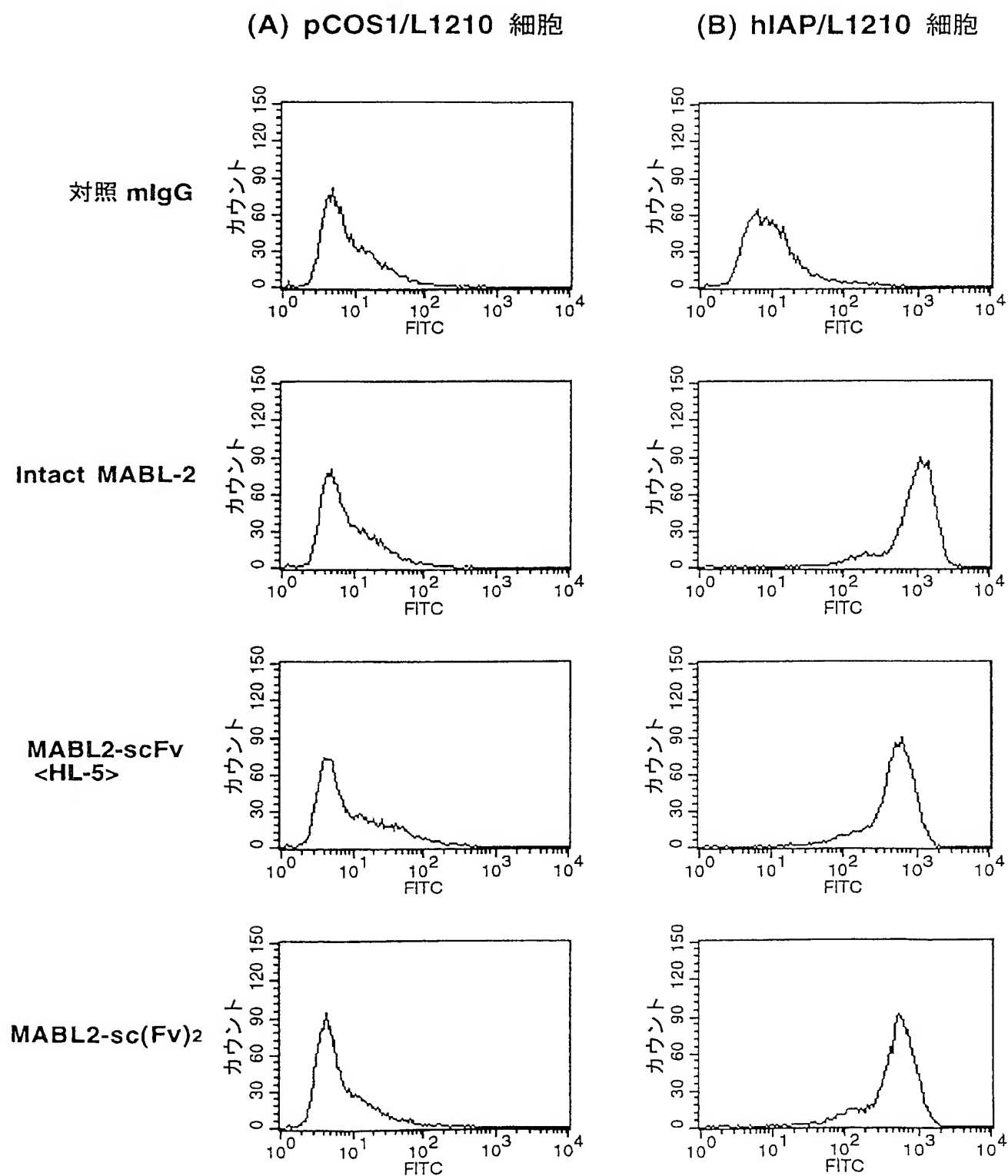


図 4 2



35/49

図 4 3

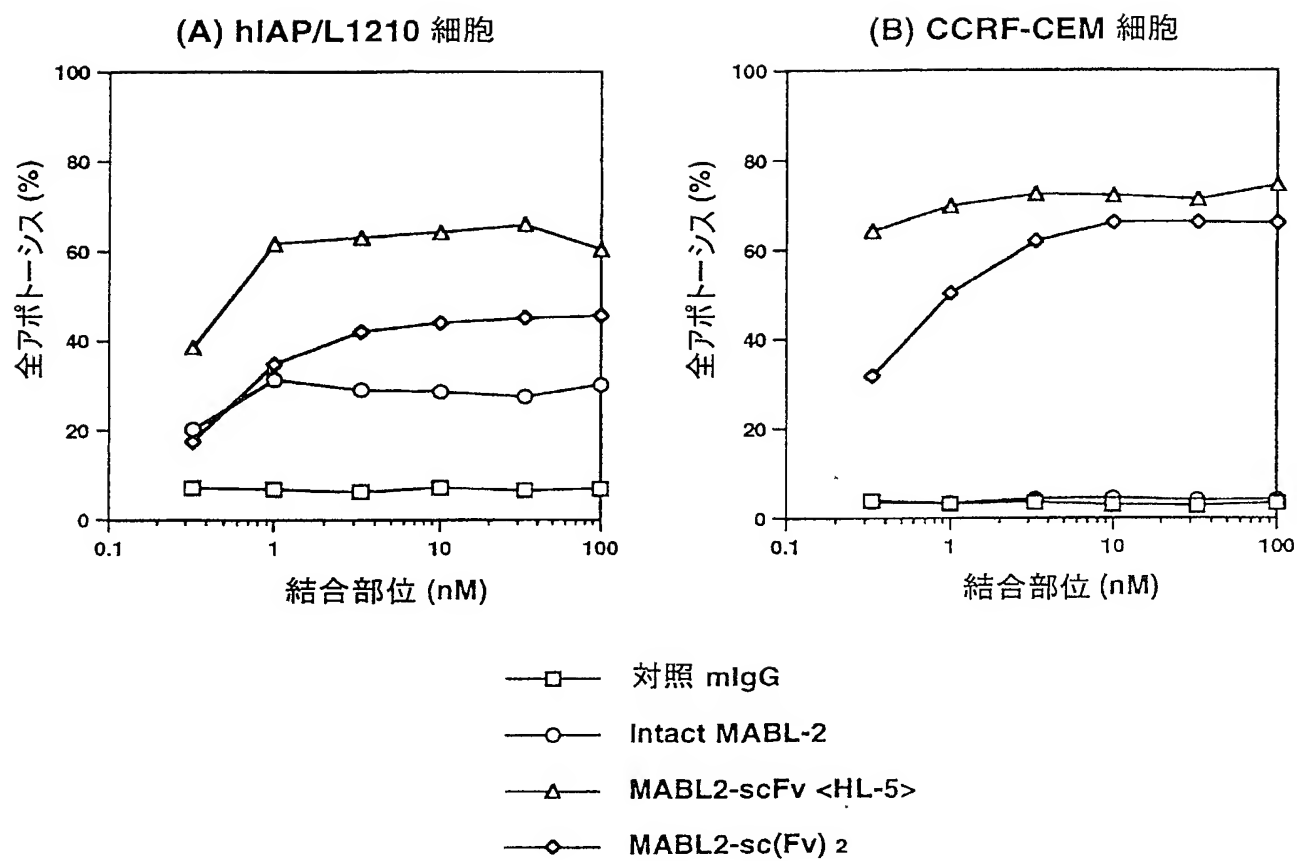
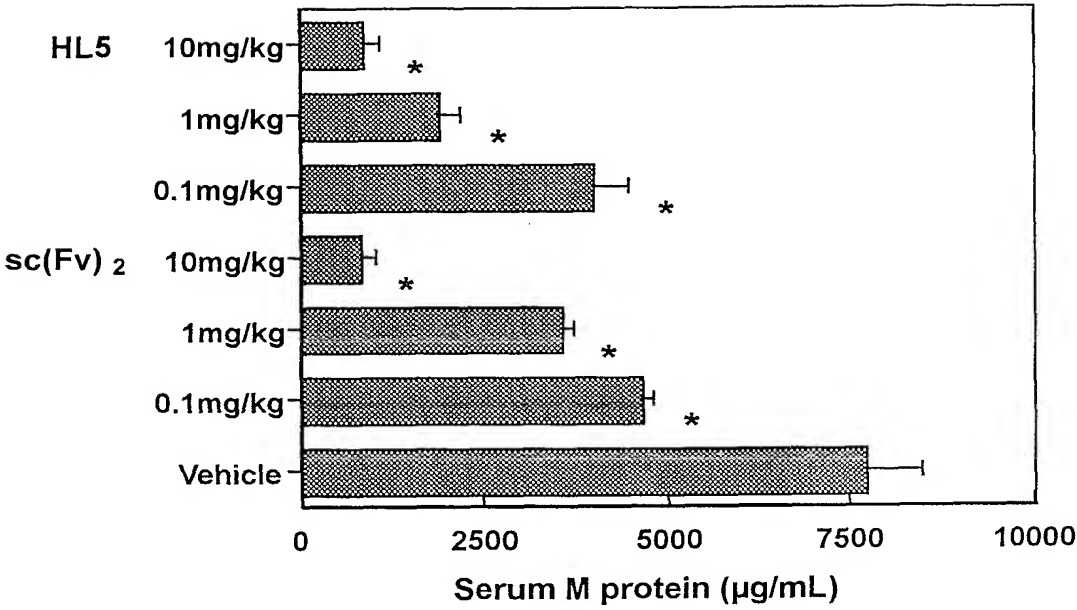
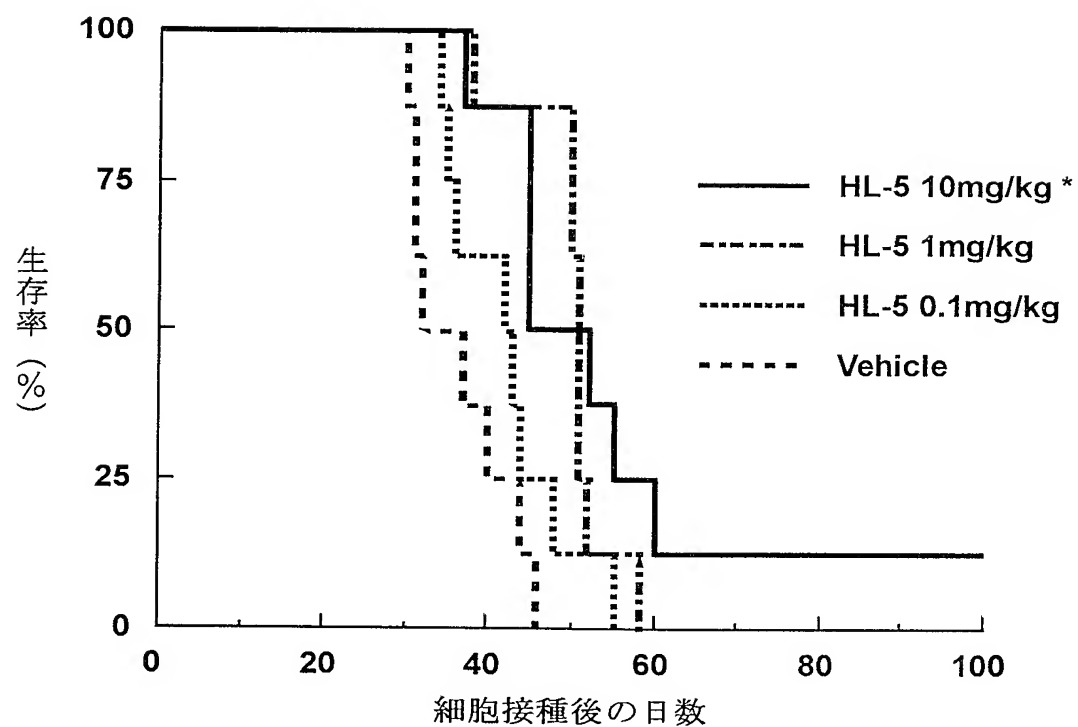


図 4 4



37/49

図 4 5



38/49

図 4 6

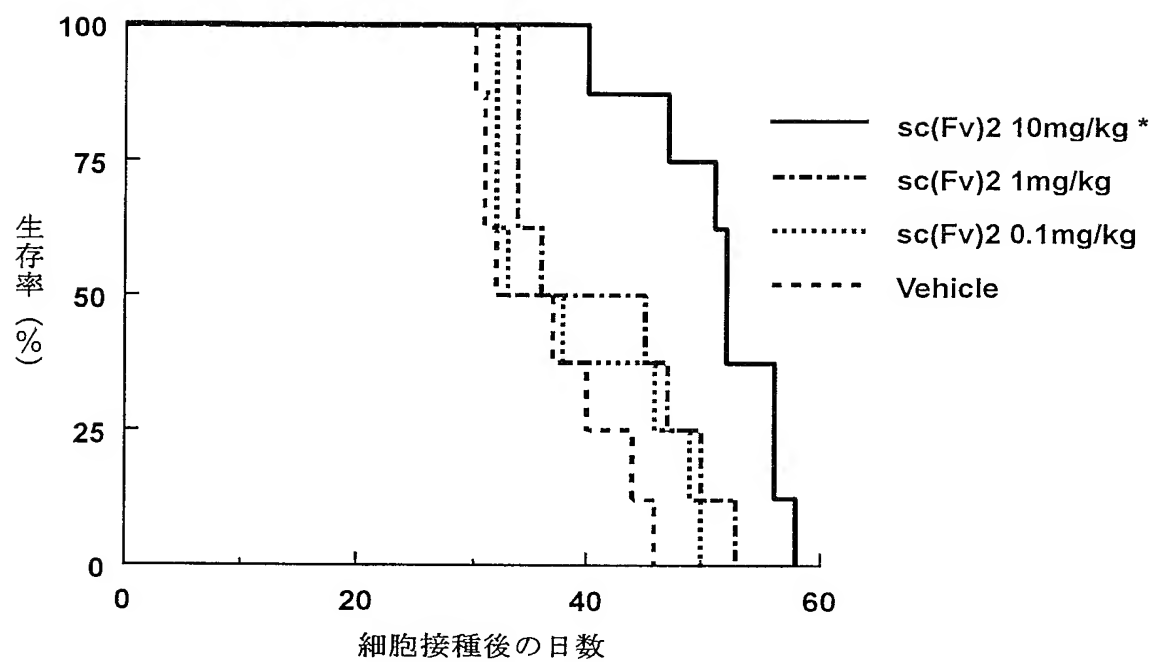
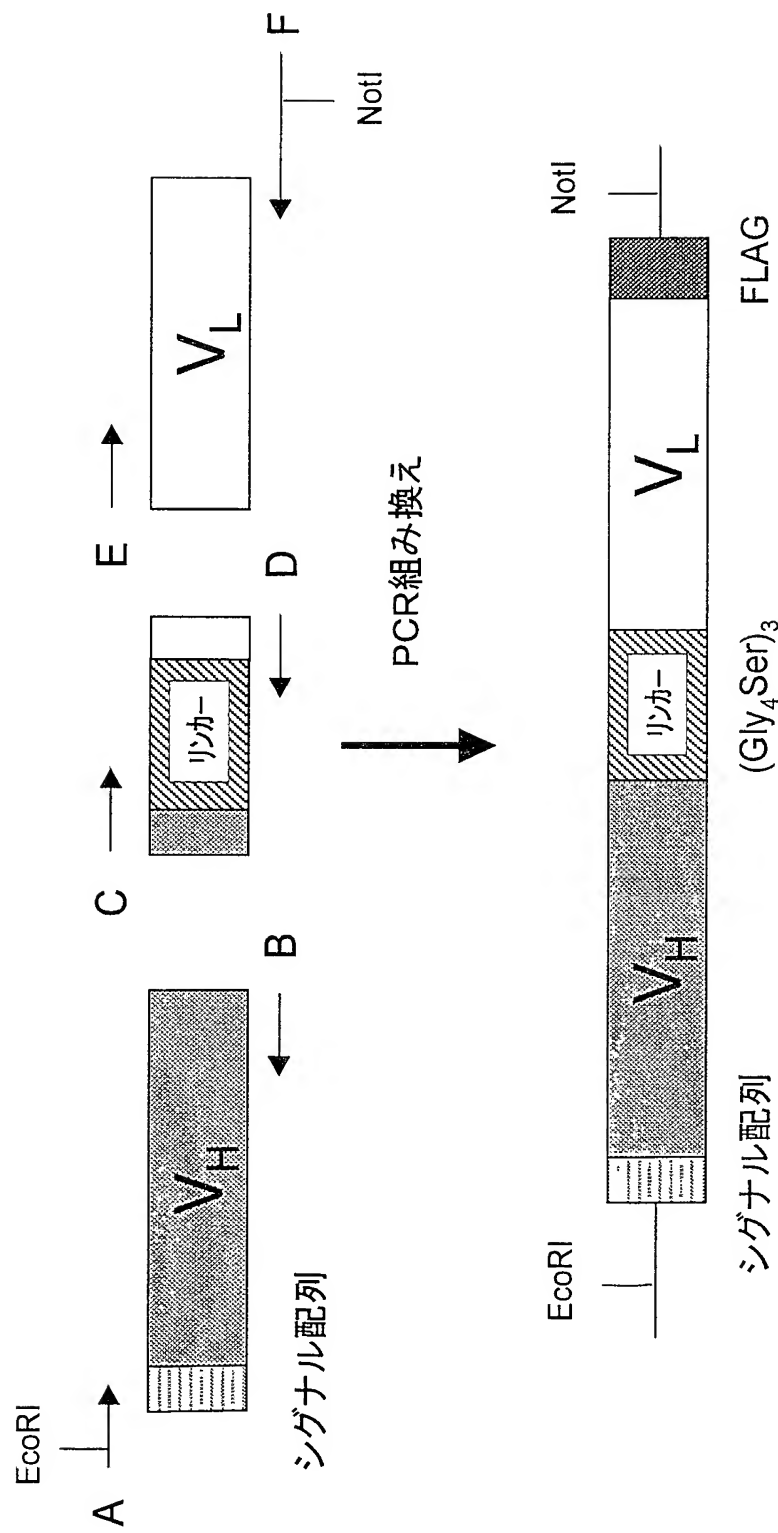


図 4 7



40/49

図 4 8

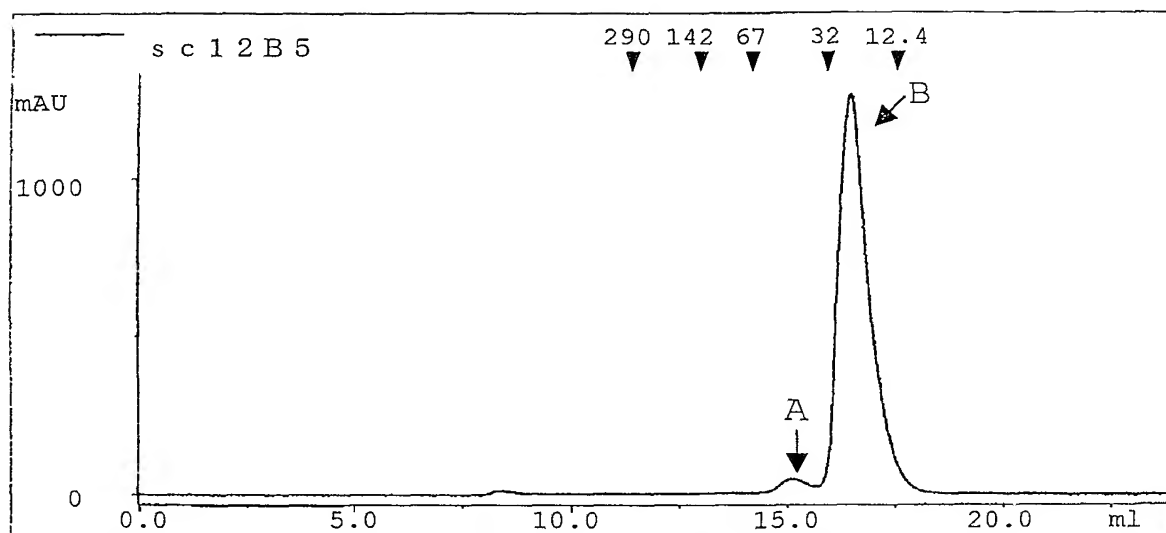


図 4 9

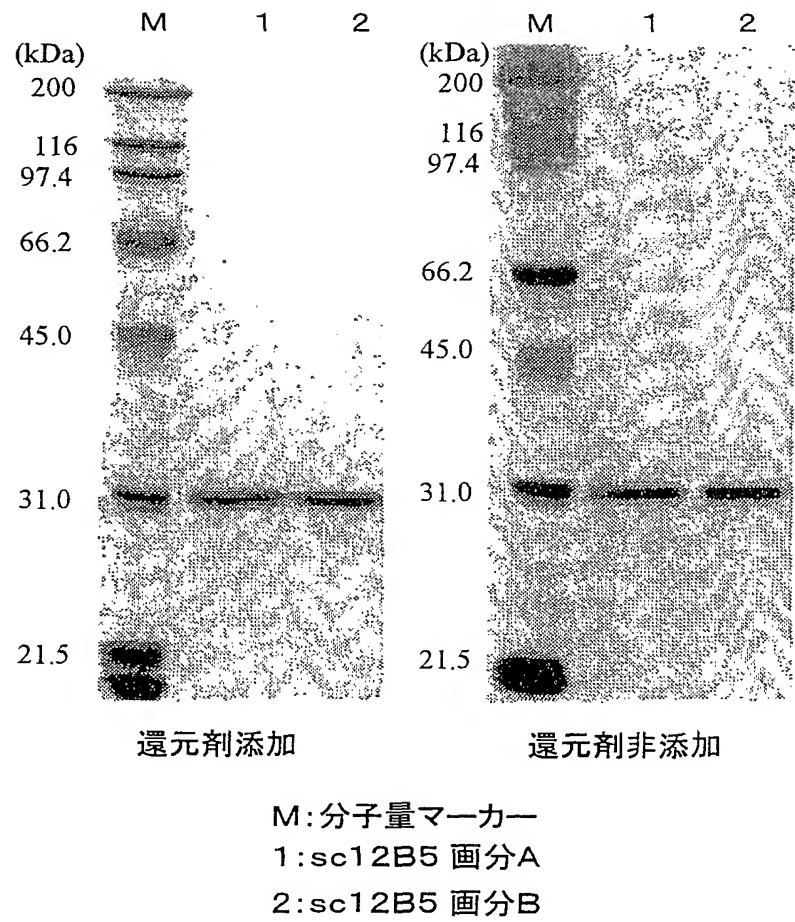
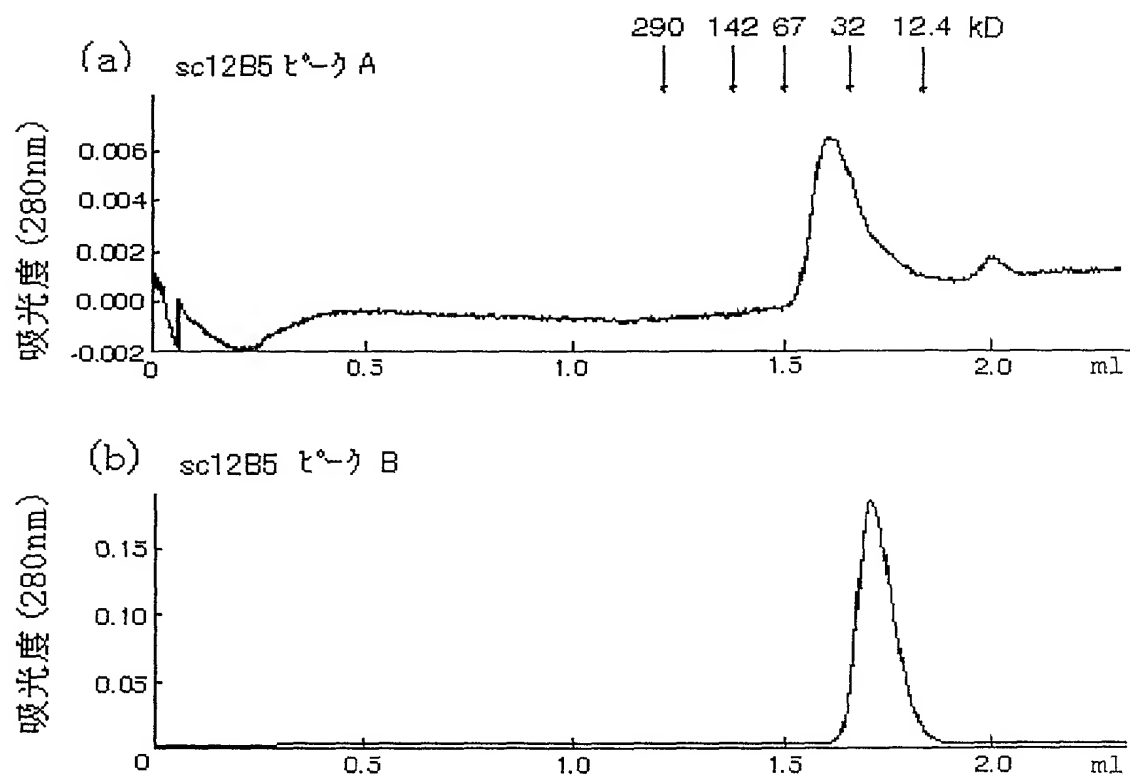


図 50



43/49

図 5 1

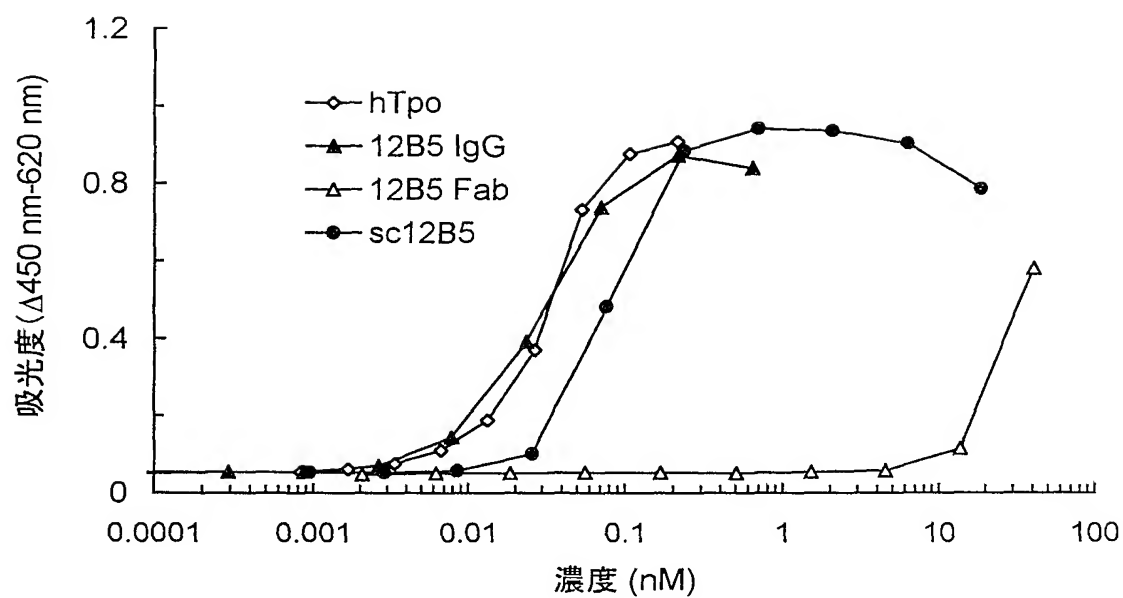


図 5 2

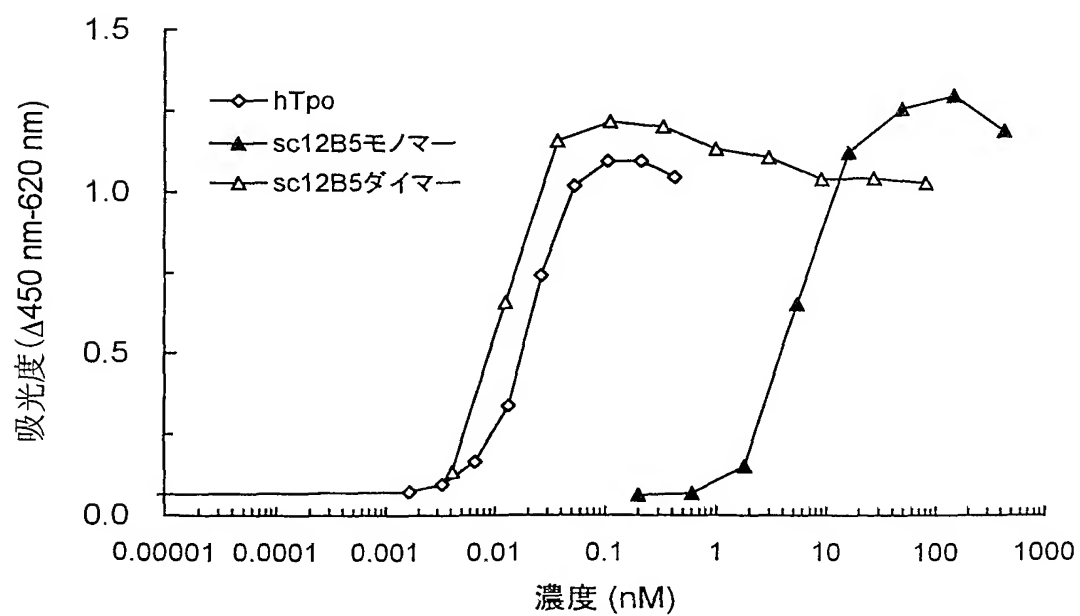
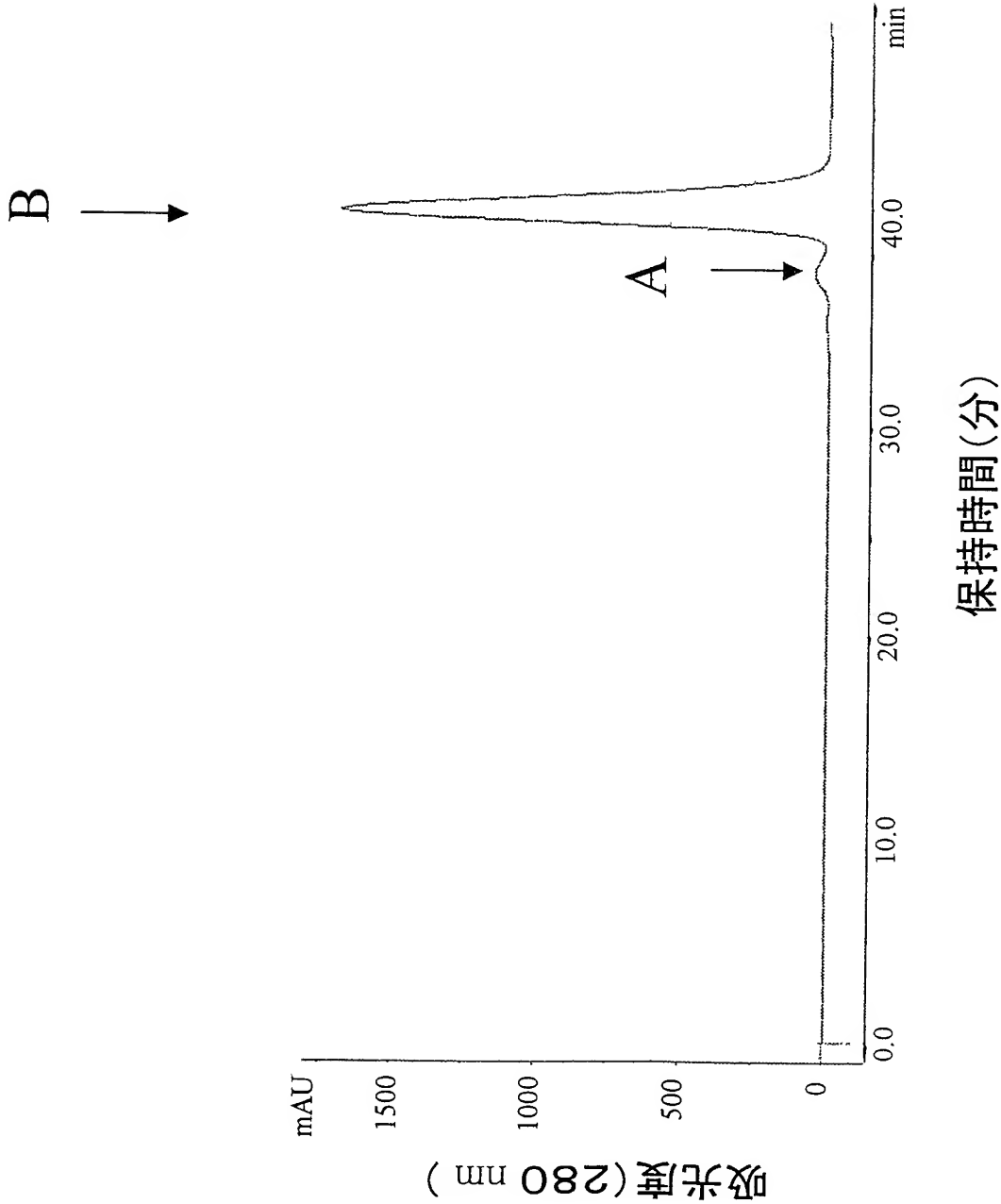


図 5 3



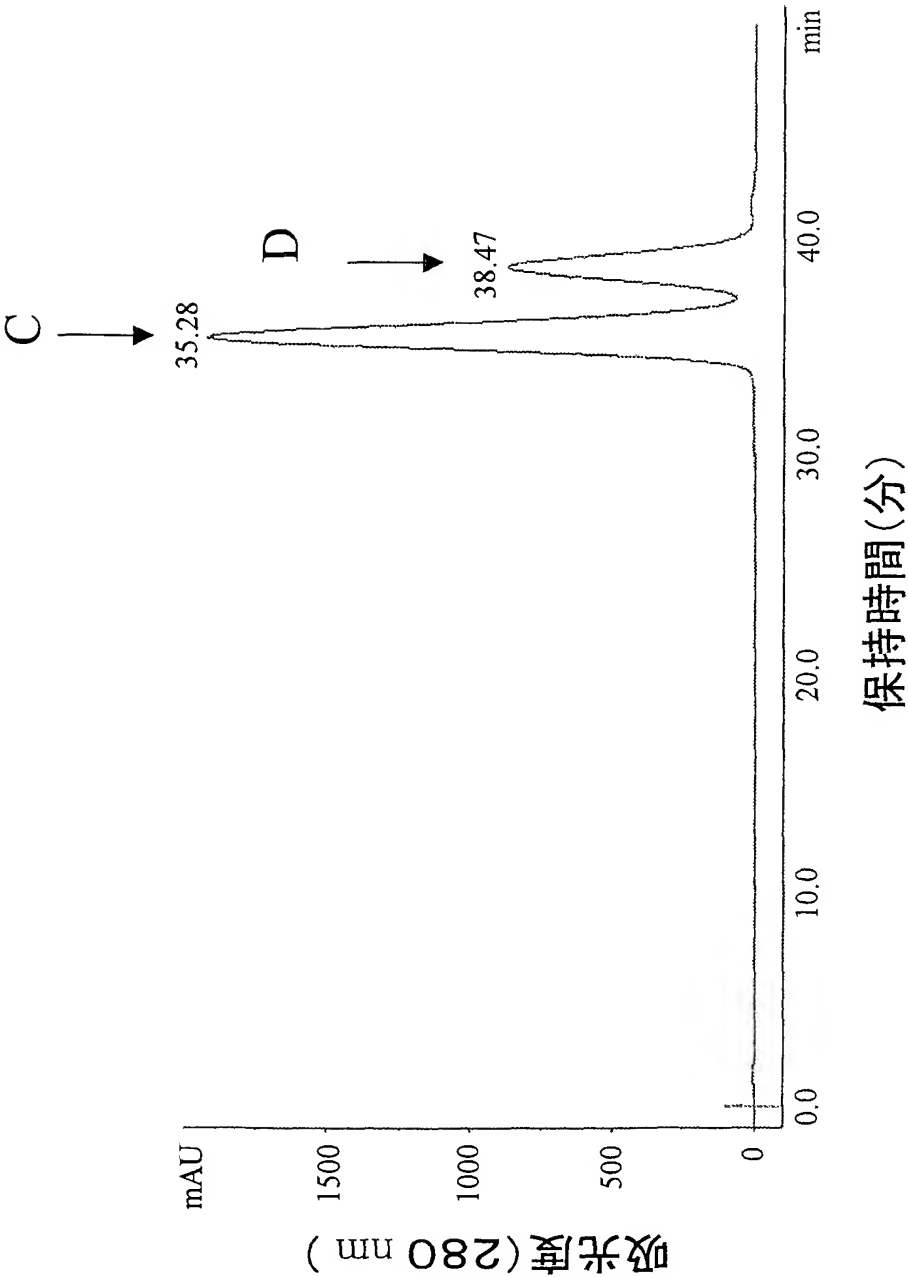


図 5 4

46/49

図 5 5

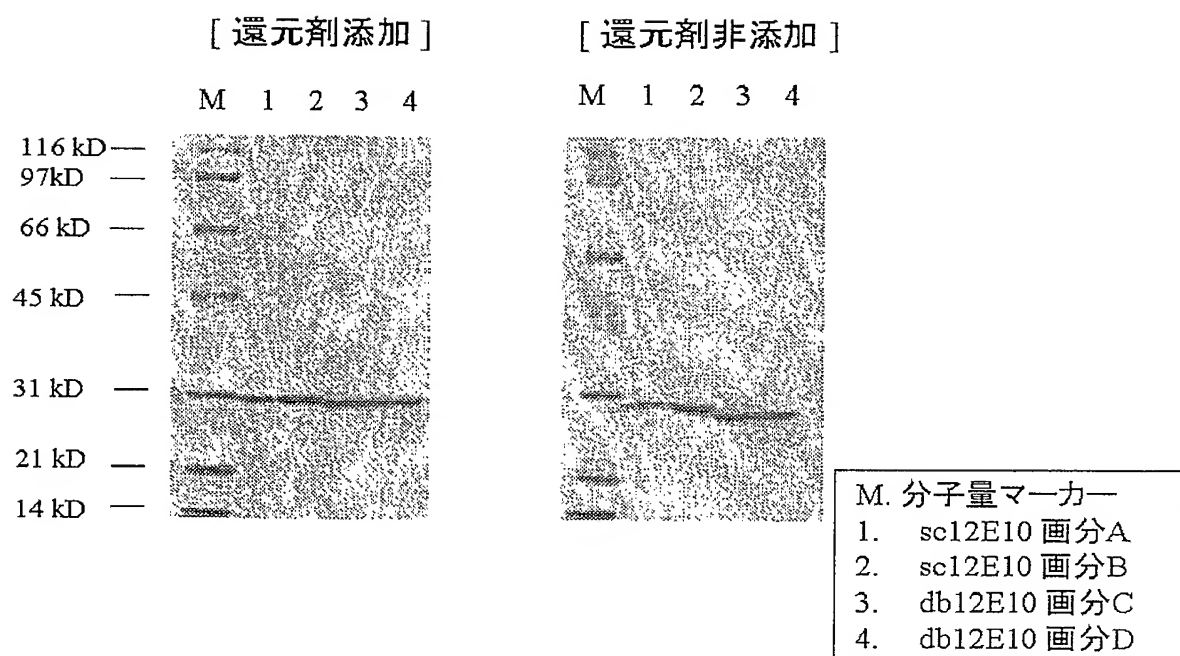
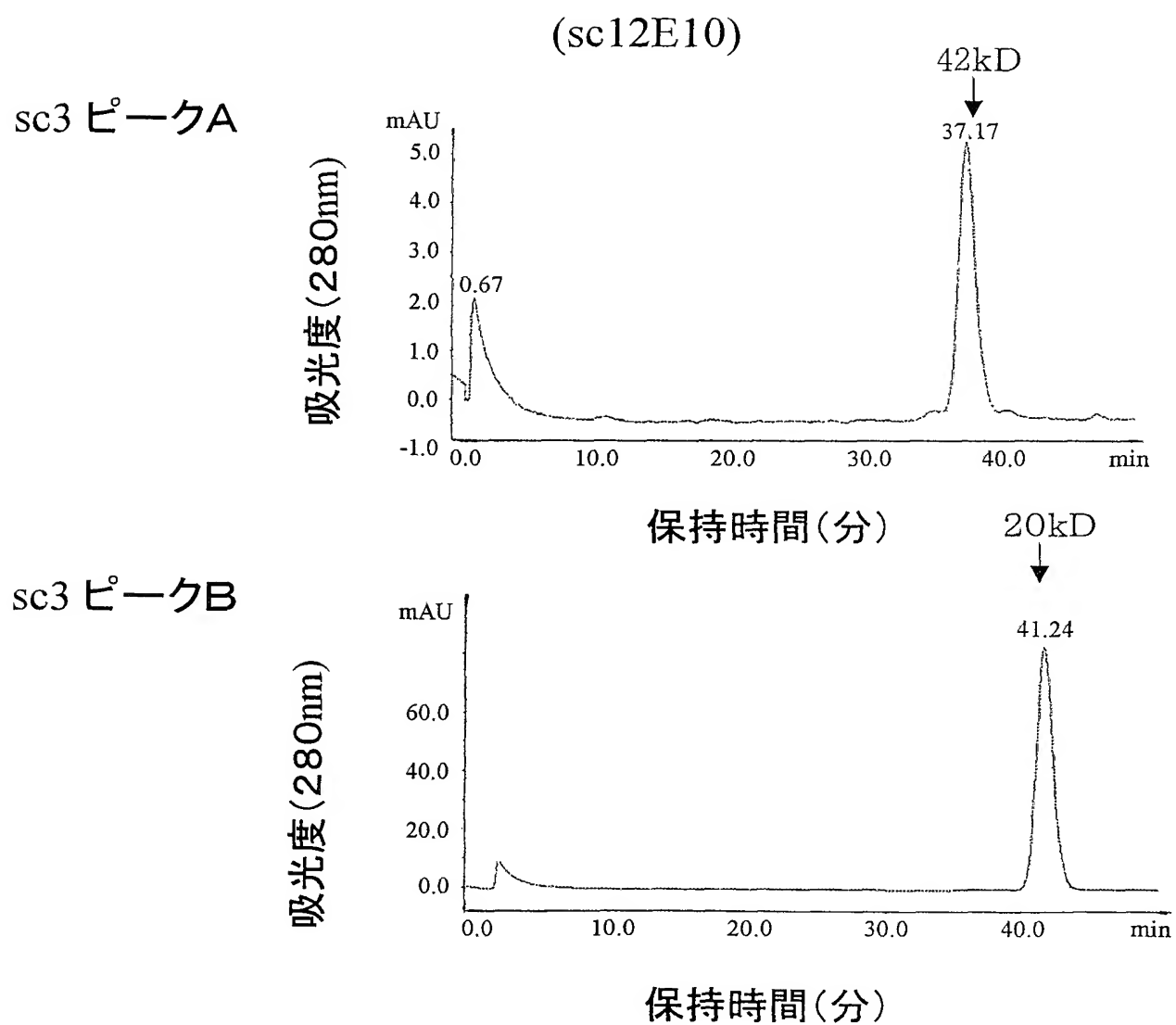


図 5 6



48/49

図 5 7

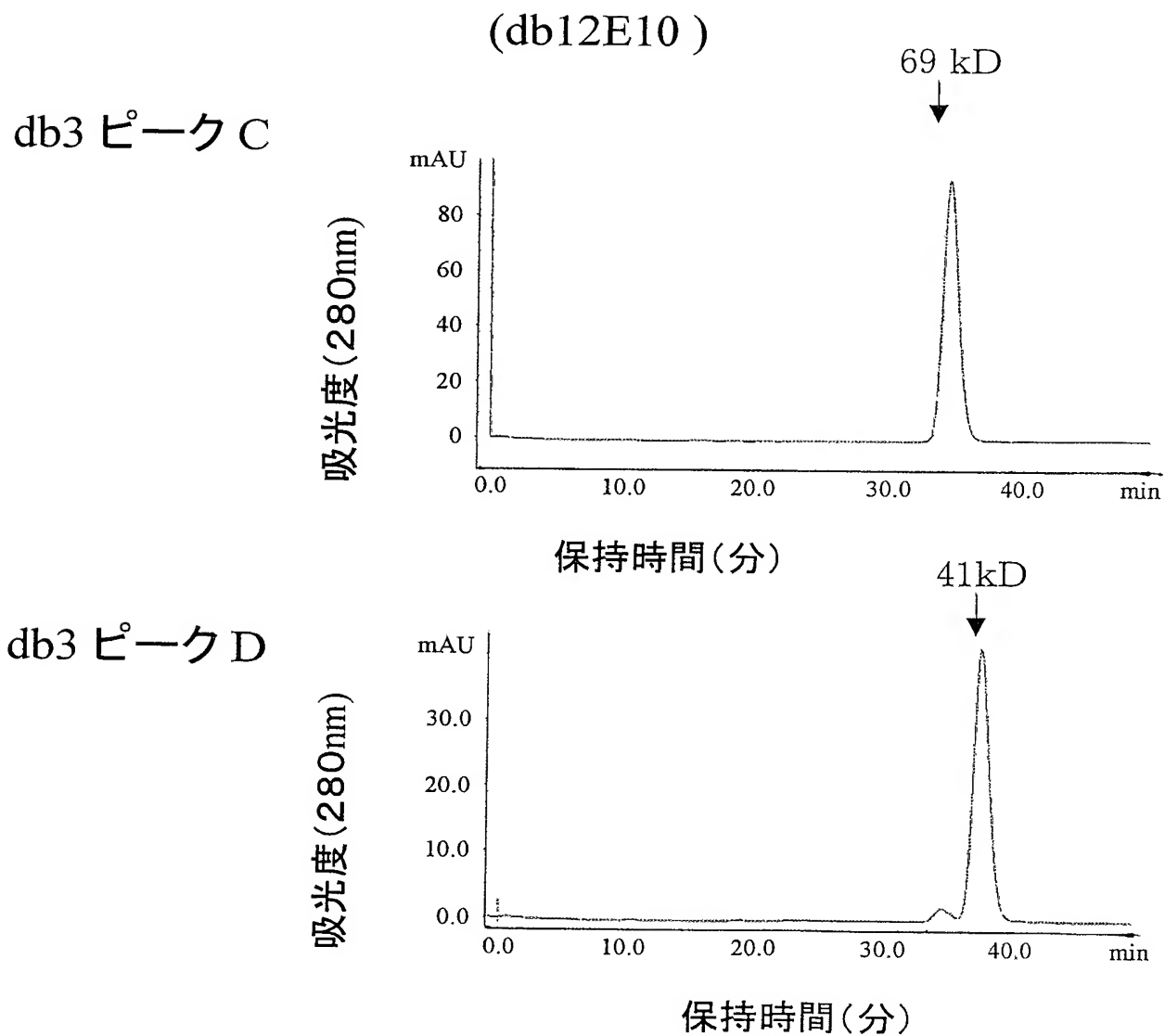


図 5 8

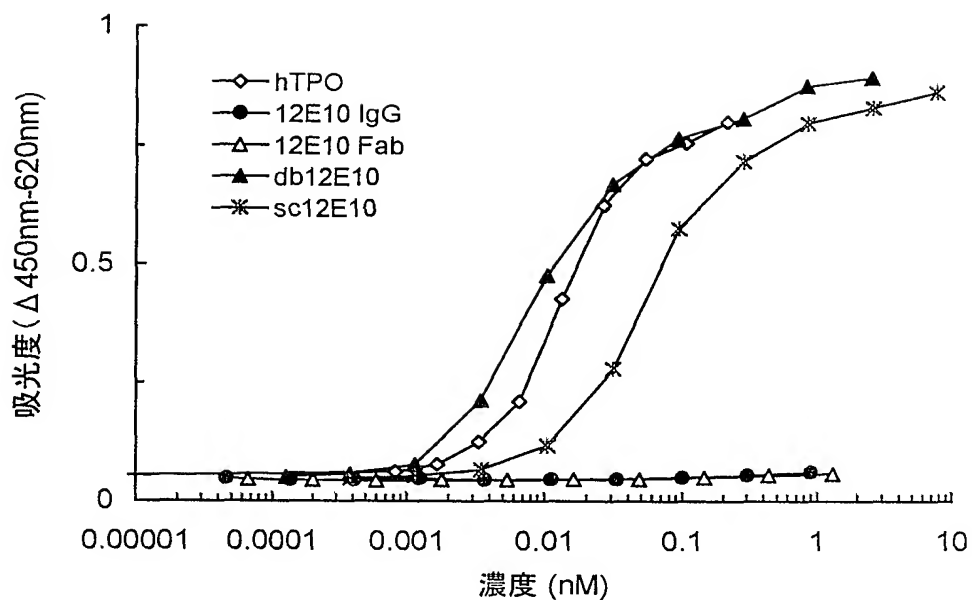
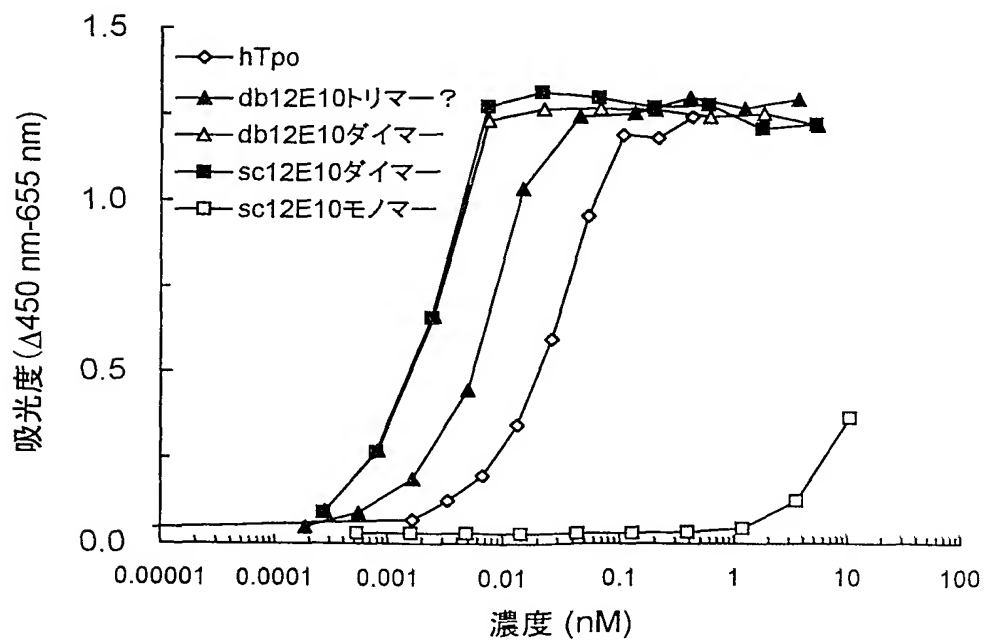


図 5 9



SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
<120> Small remodeling agonist antibody against TPO
<130> FP1033
<141> 2001-10-22
<150> JP2000-321821
<151> 2000-10-20
<150> PCT/JP01/03288
<151> 2001-04-17
<150> JP2001-277314
<151> 2001-09-12

<160> 113

<210> 1
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer
<400> 1
ccatcctaatacgaactcactatagggc 27

<210> 2
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 2

ggatcccggg tggatggtgg gaagatg 27

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 3

ggatcccggg ccagtggata gacagatg 28

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

ggatcccggg agtggataga ccgatg 26

<210> 5

<211> 394

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (393)

<223> pGEM-M1L. 1-57;signal peptide, 58-394;mature peptide

<400> 5

```

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gog      48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
      1              5              10              15
tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc      96
Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
              20              25              30
agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt     144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
              35              40              45
cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac cta cag aag cca     192
Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
              50              55              60
ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct     240
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
              65              70              75              80
ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca     288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
              85              90              95
ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc     336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
              100             105             110
tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg tcc gga ggg ggg acc aag ctg     384
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu
              115             120             125

```

gaa ata aaa c

394

Glu Ile Lys

130

<210> 6

<211> 409

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (408)

<223> pGEM-M1H. 1-57;signal peptide, 58-409;mature peptide

<400> 6

atg gaa tgg agc tgg ata ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt 48

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

1 5 10 15

gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg gta aag 96

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys

20 25 30

cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt 192

Val Asn His Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tac aat 240

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn

65 70 75 80

5/74

gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act tca gag aaa tcc tcc agc 288

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Glu Lys Ser Ser Ser

85

90

95

gca gcc tac atg gag ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc 336

Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val

100

105

110

tac tac tgt gca aga ggg ggt tac tat agt tac gac gac tgg ggc caa 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln

115

120

125

ggc acc act ctc aca gtc tcc tca g

409

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

130

135

<210> 7

<211> 394

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (393)

<223> pGEM-M2L. 1-57;signal peptide, 58-394;mature peptide

<400> 7

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct ggt 48

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Gly

1

5

10

15

tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc 96

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val

20

25

30

6/74

```

agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt 144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
      35              40              45
gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca 192
Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
      50              55              60
ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct 240
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
      65              70              75              80
ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca 288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr
              85              90              95
ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc 336
Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
              100             105             110
tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg 384
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
              115             120             125
gaa ata aaa c
Glu Ile Lys
      130

```

<210> 8

<211> 409

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (408)

<223> pGEM-M2H. 1-57;signal peptide, 58-409;mature peptide

<400> 8

```

atg gaa tgg agc tgg ata ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt   48
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
      1              5              10              15
gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag   96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
              20              25              30
cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc  144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
              35              40              45
gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag coa ggg cag ggc ctt  192
Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu
              50              55              60
gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat  240
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn
              65              70              75              80
gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc  288
Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr
              85              90              95
aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tct ggc gtc  336
Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val
              100             105             110
tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa  384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln
              115             120             125
ggc acc act ctc aca gtc tcc tca g

```

409

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

130

135

<210> 9

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 9

cccaagcttc caccatgaag ttgcctgtta gg 32

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 10

cccaagcttc caccatggaa tggagctgga ta 32

<210> 11

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

9/74

cgcggatcca ctcacgtttt atttccagct tggt 34

<210> 12

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 12

cgcggatcca ctcacctgag gagactgtga gagt 34

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 13

catgcatgg cgcaggcca gctgcagcag 30

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 14

accaccacct gaggagactg tgagagt 27

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 15

gtctcctcag gtggtggtgg ttcgggt 27

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 16

cacaacatcc gatccgccac caccga 27

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 17

ggcggatcgg atgttgtgat gacccaa 27

<210> 18

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 18

ccggaattct cattatztat cgtcatcgtc ttgtagtc tttatttcca gcttggt 57

<210> 19

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker amino acid sequence and nucleotide sequence

<400> 19

ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

5

10

15

<210> 20

<211> 828

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (822)

<223> pscM1. MABL1-scFv

12/74

<400> 20

```

atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc gct   48
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
      1              5              10              15
gcc caa cca gcc atg gcg cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac   96
Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp
              20              25              30
ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga  144
Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
              35              40              45
tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag cag aag cca ggg  192
Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly
              50              55              60
cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act  240
Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr
              65              70              75              80
aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act tca gag aaa  288
Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Glu Lys
              85              90              95
tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc agc agc ctg gcc tct gag gac  336
Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp
              100              105              110
tct gcg gtc tac tac tgt gca aga ggg ggt tac tat agt tac gac gac  384
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Ser Tyr Asp Asp
              115              120              125
tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg  432
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
              130              135              140

```

13/74

```

ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa 480
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln
145                150                155                160
act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct 528
Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser
                165                170                175
tgc aga tct agt cag agc ctt cta cac agt aaa gga aac acc tat tta 576
Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu
                180                185                190
caa tgg tac cta cag aag cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac 624
Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
                195                200                205
aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt 672
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
                210                215                220
gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag 720
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
225                230                235                240
gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg 768
Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr
                245                250                255
tcc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac 816
Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
                260                265                270
gat aaa taatga 828
Asp Lys

```


<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 21

acgcgtcgac tcccagggtcc agctgcagca g 31

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 22

gaaggtgtat ccagaagc 18

<210> 23

<211> 819

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (813)

<223> pCHOM1. MABL1-scFv

<400> 23

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt 48

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

15/74

1	5	10	15	
gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg gta aag	96			
Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys				
20	25	30		
cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc	144			
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe				
35	40	45		
gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt	192			
Val Asn His Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu				
50	55	60		
gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tac aat	240			
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn				
65	70	75	80	
gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act tca gag aaa tcc tcc agc	288			
Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Glu Lys Ser Ser Ser				
85	90	95		
gca gcc tac atg gag ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc	336			
Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val				
100	105	110		
tac tac tgt gca aga ggg ggt tac tat agt tac gac gac tgg ggc caa	384			
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln				
115	120	125		
ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt	432			
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly				
130	135	140		
ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc	480			
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu				
145	150	155	160	

16/74

```

tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct 528
Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser
          165          170          175
agt cag agc ctt cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac 576
Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr
          180          185          190
cta cag aag cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc 624
Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser
          195          200          205
aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg 672
Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
          210          215          220
aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720
Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly
225          230          235          240
gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg tcc gga ggg 768
Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Ser Gly Gly
          245          250          255
ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat aaa taa 816
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
          260          265          270
tga
919

```

<210> 24

<211> 828

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (822)

<223> pscM2. MABL2-scFv

<400> 24

atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc gct 48

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala

1 5 10 15

gcc caa cca gcc atg gcg cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa 96

Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu

20 25 30

ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 144

Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35 40 45

tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg 192

Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly

50 55 60

cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act 240

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr

65 70 75 80

aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa 288

Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys

85 90 95

tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac 336

Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp

100 105 110

tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac 384

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp

115 120 125

18/74

tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg 432
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa 480
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln
 145 150 155 160
 agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct 528
 Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser
 165 170 175
 tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta 576
 Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr
 180 185 190
 cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac 624
 His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 195 200 205
 aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt 672
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 210 215 220
 gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag 720
 Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 225 230 235 240
 gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg 768
 Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr
 245 250 255
 ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac 816
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
 260 265 270
 gat aaa taatga 828

19/74

Asp Lys

<210> 25

<211> 819

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (813)

<223> pCHOM2. MABL2-scFv

<400> 25

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt 48

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag 96

Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys

20 25 30

cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt 192

Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat 240

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn

65 70 75 80

gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc 288

Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr

20/74

85	90	95	
aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc			336
Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val			
100	105	110	
tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa			384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln			
115	120	125	
ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt			432
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
130	135	140	
ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc			480
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu			
145	150	155	160
tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca			528
Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser			
165	170	175	
agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac			576
Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr			
180	185	190	
ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc			624
Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser			
195	200	205	
aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg			672
Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val			
210	215	220	
aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga			720
Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly			
225	230	235	240

21/74

gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg 768
 Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
 245 250 255
 ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat aaa taa 816
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 260 265 270
 tga 819

<210> 26

<211> 456

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (450)

<223> pCHO-shIAP. Soluble human IAP

<400> 26

atg tgg ccc ctg gta gcg gcg ctg ttg ctg ggc tcg gcg tgc tgc gga 48
 Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly
 1 5 10 15
 tca gct cag cta cta ttt aat aaa aca aaa tct gta gaa ttc acg ttt 96
 Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe
 20 25 30
 tgt aat gac act gtc gtc att cca tgc ttt gtt act aat atg gag gca 144
 Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala
 35 40 45
 caa aac act act gaa gta tac gta aag tgg aaa ttt aaa gga aga gat 192
 Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp

22/74

50 55 60
 att tac acc ttt gat gga gct cta aac aag tcc act gtc ccc act gac 240
 Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp
 65 70 75 80
 ttt agt agt gca aaa att gaa gtc tca caa tta cta aaa gga gat gcc 288
 Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala
 85 90 95
 tct ttg aag atg gat aag agt gat gct gtc tca cac aca gga aac tac 336
 Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr
 100 105 110
 act tgt gaa gta aca gaa tta acc aga gaa ggt gaa acg atc atc gag 384
 Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu
 115 120 125
 cta aaa tat cgt gtt gtt tca tgg ttt tct cca aat gaa aat gac tac 432
 Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Asp Tyr
 130 135 140
 aag gac gac gat gac aag tgatag 456
 Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 145 150

<210> 27

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 27

ggaattccat atgcaagtgc aacttcaaca gtctggacct gaactg 46

23/74

<210> 28

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 28

ggaattctca ttatatttatt tccagcttgg t 31

<210> 29

<211> 741

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (735)

<223> pscM2DEm02. MABL2-scFv

<400> 29

atg caa gtg caa ctt caa cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg 48

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly

1

5

10

15

gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc gct aac 96

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn

20

25

30

cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg 144

His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

35

40

45

24/74

```

att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag 192
Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys
      50                55                60

ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc 240
Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala
      65                70                75                80

tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tot gcg gtc tat tac 288
Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
                85                90                95

tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc 336
Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr
                100                105                110

act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg 384
Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
                115                120                125

ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg 432
Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu
                130                135                140

cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag 480
Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
      145                150                155                160

agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag 528
Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln
                165                170                175

aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga 576
Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
                180                185                190

ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca gat 624

```

25/74

Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp
195 200 205
ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat 672
Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr
210 215 220
ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc 720
Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
225 230 235 240
aag ctg gaa ata aaa taatga 741
Lys Leu Glu Ile Lys
245

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 30

cagacagtgg ttcaaagt 18

<210> 31

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 31

26/74

cgcgtcgacc gatccgccac caccogaacc accaccaccc gaaccaccac caccttttat 60
 ttccagcttg gt 72

<210> 32

<211> 1605

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (1599)

<223> pCHOM2 (Fv) 2. MABL2-sc (Fv) 2

<400> 32

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt 48
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag 96
 Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 144
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt 192
 Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat 240
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn
 65 70 75 80
 gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc 288

27/74

Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr
 85 90 95
 aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc 336
 Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln
 115 120 125
 ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt 432
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 130 135 140
 ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc 480
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu
 145 150 155 160
 tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca 528
 Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser
 165 170 175
 agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac 576
 Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr
 180 185 190
 ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc 624
 Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser
 195 200 205
 aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg 672
 Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val
 210 215 220
 aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720
 Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly

28/74

225	230	235	240	
ggt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg	768			
Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly				
245	250	255		
ggg acc aag ctg gaa ata aaa ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt	816			
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly				
260	265	270		
tcg ggt ggt ggc gga tcg gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct	864			
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser				
275	280	285		
gga cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag	912			
Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys				
290	295	300		
gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag	960			
Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln				
305	310	315	320	
aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat	1008			
Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn				
325	330	335		
gat ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act	1056			
Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr				
340	345	350		
tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc	1104			
Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala				
355	360	365		
tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act	1152			
Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr				
370	375	380		

tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt 1200
 Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
 385 390 395 400
 ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg 1248
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val
 405 410 415
 atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc 1296
 Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala
 420 425 430
 tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag 1344
 Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys
 435 440 445
 acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc 1392
 Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu
 450 455 460
 ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc 1440
 Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 465 470 475 480
 agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg 1488
 Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val
 485 490 495
 gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt 1536
 Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val
 500 505 510
 ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa 1584
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys
 515 520 525
 gac gat gac gat aaa taatga 1605

Asp Asp Asp Asp Lys

530

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 33

tgaggaattc ccaccatggg atg 33

<210> 34

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 34

cacgacgtca ctcgagactg tgagagtggg gccttggtccc 40

<210> 35

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 35

31/74

agtctcgagt gacgtcgtga tgacccaaag tccactctcc 40

<210> 36

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 36

gactggatcc tcattattta togtcatcgt c 31

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 37

cgcgtaatac gactcactat ag 22

<210> 38

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 38

gcaattggac ctgtttttatc togagcttgg tccccctcc gaacgt 46

<210> 39

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 39

gctcgagata aaacaggtcc aattgcagca gtctggacct gaact 45

<210> 40

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 40

gactggatcc tcattattta tcgtcatcgt cttttagtc tgaggagact gtgagagtgg 60

<210> 41

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 41

gactgaattc ccaccatgaa gttgcctggt ag 32

<210> 42

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 42

cagtctcgag tggtaggtcc gacgtcgtga tgacccaaag 40

<210> 43

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 43

cagtctcgag tggtaggtgt tccgacgtcg tgatgacca aag 43

<210> 44

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 44

cagtctcgag tggtaggtgt ggttccgacg tcgtgatgac ccaaag 46

<210> 45

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 45

cagtctcgag tggtaggtggg ggtgggttccg acgtcgtgat gacccaaag 49

<210> 46

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 46

cagtctcgag tggtaggtggg ggtgggtggtt ccgacgtcgt gatgacccaa ag 52

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 47

ggccgcatgt tgtcacgaat 20

<210> 48

<211> 780

35/74

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (768)

<223> CF2HL-0/pCOS1. MABL2-scFv<HL-0>

<400> 48

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt gtc 51

MET Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val

5

10

15

gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg 102

Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly

20

25

30

gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat 153

Ala Ser Val Lys MET Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His

35

40

45

50

gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga 204

Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

55

60

65

tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac 255

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp

70

75

80

85

aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc 306

Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr MET Asp Leu

90

95

100

agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt 357

Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly

105

110

115

36/74

tac tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcg agt 408
Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
120 125 130 135
gac gtc gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat 459
Asp Val Val MET Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp
140 145 150
caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga 510
Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly
155 160 165 170
aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc 561
Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu
175 180 185
ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt 612
Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
190 195 200
ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct 663
Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu MET Ile Ser Arg Val Glu Ala
205 210 215 220
gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg 714
Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr
225 230 235
ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 765
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
240 245 250 255
aaa taa tga gga tcc 780
Lys

<210> 49

37/74

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 49

caagctcgag ataaaatccg gaggccaggt ccaattgcag cagtc 45

<210> 50

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 50

caagctcgag ataaaatccg gaggtggcca ggtccaattg cagcagtc 48

<210> 51

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 51

caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg ccaggtccaa ttgcagcagt c 51

<210> 52

<211> 54

38/74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 52

caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg tggccaggtc caattgcagc agtc 54

<210> 53

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 53

caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg tggcggccag gtccaattgc agcagtc 57

<210> 54

<211> 780

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (768)

<223> CF2LH-0/pCOS1. MABL2-scFv<LH-0>

<400> 54

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct ggt tcc 51

MET Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu MET Phe Trp Ile Pro Gly Ser

39/74

agc agt gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt 102
 Ser Ser Asp Val Val MET Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu

20

25

30

gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt 153
 Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

35

40

45

50

aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca 204
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro

55

60

65

aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg 255
 Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg

70

75

80

85

ttc agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg 306
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu MET Ile Ser Arg Val

90

95

100

gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg 357
 Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro

105

110

115

tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctc gag ata aaa cag gtc caa ttg cag 408
 Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Val Gln Leu Gln

120

125

130

135

cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc 459
 Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys MET Ser Cys

140

145

150

aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag 510
 Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln

155

160

165

170

aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 561

40/74

Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp
 175 180 185
 ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac 612
 Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp
 190 195 200
 aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac 663
 Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr MET Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp
 205 210 215 220
 tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg 714
 Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp
 225 230 235
 ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca gac tac aaa gac gat gac gat 765
 Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
 240 245 250 255
 aaa taa tga gga tcc 780
 Lys

<210> 55

<211> 351

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (351)

<223> 12B5HV. 1-351 peptide

<400> 55

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gtc cgg ccc ggg ggg 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly

41/74

1	5	10	15	
tcc ctg agt ctc tcc tgt gca gtc tct gga atc acc ctc agg acc tac	96			
Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Thr Leu Arg Thr Tyr				
20	25	30		
ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg	144			
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val				
35	40	45		
gca ggt ata tcc ttt gac gga aga agt gaa tac tat gca gac tcc gtg	192			
Ala Gly Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val				
50	55	60		
cag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac agt tcc aag aac acc ctg tat	240			
Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu Tyr				
65	70	75	80	
ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt	288			
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
85	90	95		
gcg aga gga gca cat tat ggt ttc gat atc tgg ggc caa ggg aca atg	336			
Ala Arg Gly Ala His Tyr Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met				
100	105	110		
gtc acc gtc tcg agt			351	
Val Thr Val Ser Ser				
115				

<210> 56

<211> 57

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (57)

<223> reader sequence

<400> 56

atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt 48

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

5

10

15

gtc cag tgt

57

Val Gln Cys

<210> 57

<211> 115

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VH-1

<400> 57

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtccggcccg gggggtccct gagtc 115

<210> 58

<211> 115

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VH-2

<400> 58

43/74

aaggatatac ctgccaccca ctccagcccc ttgcctggag cctggcggac ccagtgcattg 60
ccgtagggtcc tgagggtgat tccagagact gcacaggaga gactcaggga ccccc 115

<210> 59

<211> 115

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VH-3

<400> 59

ggcaggtata tcctttgacg gaagaagtga atactatgca gactcogtgc agggccgatt 60
caccatctcc agagacagtt ccaagaacac cctgtatctg caaatgaaca gcctg 115

<210> 60

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VH-4

<400> 60

actcgagacg gtgaccattg tcccttggcc ccagatatcg aaaccataat gtgctcctct 60
cgcacagtaa tacacagccg tgtcctcggc tctcaggctg ttcatttg 108

<210> 61

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

44/74

<223> 12B5VH-S, PCR primer

<400> 61

ttcaagcttc caccatggag tttgggctga gc 32

<210> 62

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VH-A, PCR primer

<400> 62

ttgggatcca ctcaccactc gagaagggtga ccat 34

<210> 63

<211> 588

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (236)... (558)

<223> 1-235;intron, 236-558;Human IgG constant region (partial)

<400> 63

gaattcgtga gtggatccca agctagcttt ctggggcagg ccaggcctga ccttggcttt 60

ggggcaggga gggggctaag gtgaggcagg tggcgccagc caggtgcaca cccaatgccc 120

atgagcccag acaactggacg ctgaacctcg cggacagtta agaaccagg ggccctctgag 180

ccctgggccc agctctgtcc cacaccgagg tcacatggca caacctctct tgca gcc 237

Ala

45/74

```

tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc      285
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
      5              10              15
acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc      333
Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
      20              25              30
ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc      381
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
      35              40              45
gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc      429
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
      50              55              60              65
agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac      477
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
      70              75              80
atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa      525
Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
      85              90              95
gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca                        558
Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
      100              105

```

<210> 64

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> G1CH1-S, PCR primer

46/74

<400> 64

tgagaattcg tgagtggatc ccaagct 27

<210> 65

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> G1CH1-A, PCR primer

<400> 65

aaaagatctt tatcatgtgt gagttttgtc acaagatttg ggctcaactt tcttgtccac 60

<210> 66

<211> 432

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (12)... (419)

<223> HEF-12B5H-g gamma. 12-419 peptide

<400> 66

aagcttccac c atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt 50

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu

1

5

10

tta aga ggt gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc 98

Leu Arg Gly Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly

15

20

25

ttg gtc cgg ccc ggg ggg tcc ctg agt ctc tcc tgt gca gtc tct gga 146

47/74

Leu Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly
 30 35 40 45
 atc acc ctc agg acc tac ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc 194
 Ile Thr Leu Arg Thr Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 50 55 60
 aag ggg ctg gag tgg gtg gca ggt ata tcc ttt gac gga aga agt gaa 242
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Glu
 65 70 75
 tac tat gca gac tcc gtg cag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac agt 290
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser
 80 85 90
 tcc aag aac acc ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac 338
 Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 95 100 105
 acg gct gtg tat tac tgt gcg aga gga gca cat tat ggt ttc gat atc 386
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala His Tyr Gly Phe Asp Ile
 110 115 120 125
 tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tcg agt ggtgagtgga tcc 432
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 67

<211> 321

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (321)

48/74

<223> 12B5LV. 1-321 peptide

<400> 67

gac atc cag atg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca tct att gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly
1 5 10 15
gac aga gtc acc atc acc tgc cgg gcc agc gag ggt att tat cac tgg 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp
20 25 30
ttg gcc tgg tat cag cag aag cca ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
tat aag gcc tct agt tta gcc agt ggg gcc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
gat gat ttt gca act tat tac tgc caa caa tat agt aat tat ccg ctc 288
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu
85 90 95
act ttc ggc gga ggg acc aag ctg gag atc aaa 321
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 68

<211> 66

<212> DNA

<213> Human

49/74

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (66)

<223> reader sequence

<400> 68

atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctc ctg ctg ctc tgg 48

MET Asp MET Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

5

10

15

ctc cca ggt gcc aaa tgt

66

Leu Pro Gly Ala Lys Cys

20

<210> 69

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-1

<400> 69

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggct ccaggtgcc 60

aaatgtgaca tccagatgac ccagtctcct tccaccctgt ctgcatctat 110

<210> 70

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-2

50/74

<400> 70

ggagtttagg ggctttccct ggcttctgct gataccagc caaccagtga taaataccct 60
cgctggcccg gcaggtgatg gtgactctgt ctccaataga tgcagacagg 110

<210> 71

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-3

<400> 71

aagcccctaa actcctgatc tataaggcct ctagtttagc cagtggggcc ccatcaaggt 60
tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 110

<210> 72

<211> 103

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-4

<400> 72

tttgatctcc agcttggtcc ctccgcgaa agtgagcgga taattactat attgttggca 60
gtaataagtt gcaaaatcat caggctgcag gctgctgatg gtg 103

<210> 73

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

51/74

<220>

<223> 12B5VL-S, PCR primer

<400> 73

ttcaagcttc caccatggac atgagggtcc cc 32

<210> 74

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-A, PCR primer

<400> 74

tctaggatcc actcacgttt gatctccagc ttggt 35

<210> 75

<211> 415

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (12)... (398)

<223> HEF-12B5H-g kappa. 12-398 peptide

<400> 75

aagcttccac c atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctc ctg 50

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu

1

5

10

ctg ctc tgg ctc cca ggt gcc aaa tgt gac atc cag atg acc cag tct 98

Leu Leu Trp Leu Pro Gly Ala Lys Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser

52/74

15	20	25	
cct tcc acc ctg tct gca tct att gga gac aga gtc acc atc acc tgc	146		
Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys			
30	35	40	45
cgg gcc agc gag ggt att tat cac tgg ttg gcc tgg tat cag cag aag	194		
Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys			
	50	55	60
cca ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc tat aag gcc tct agt tta gcc	242		
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Ala			
	65	70	75
agt ggg gcc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc	290		
Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe			
	80	85	90
act ctc acc atc agc agc ctg cag cct gat gat ttt gca act tat tac	338		
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr			
	95	100	105
tgc caa caa tat agt aat tat ccg ctc act ttc ggc gga ggg acc aag	386		
Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys			
110	115	120	125
ctg gag atc aaa cgtgagtgga tcttaga			415
Leu Glu Ile Lys			

<210> 76

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FLAG tag sequence

53/74

<400> 76

gac tac aag gat gac gac gat aag 24

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

5

<210> 77

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5-S, PCR primer

<400> 77

atagaattcc accatggagt ttgggctgag c 31

<210> 78

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HuVHJ3, PCR primer

<400> 78

tgaagagacg gtgaccattg tccc 24

<210> 79

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RhuJH3, PCR primer

<400> 79

ggacaatggg caccgtctct tcaggtgg 28

<210> 80

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RhuVK1, PCR primer

<400> 80

ggagactggg tcattctggat gtccgatccg cc 32

<210> 81

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HuVK1.2, PCR primer

<400> 81

gacatccaga tgaccagtc tcc 23

<210> 82

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5F-A, PCR primer

<400> 82

attgcggcgcg cttatcactt atcgtcgtca tccttgtagt ctttgatctc cagcttggt 59

<210> 83

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker amino acid sequence and nucleotide sequence

<400> 83

ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

5

10

15

<210> 84

<211> 823

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (12)... (809)

<223> sc12B5, Single chain Fv

<400> 84

aagcttccac c atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt 50

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu

1

5

10

tta aga ggt gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg cag tot ggg gga ggc 98

Leu Arg Gly Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly

56/74

15	20	25	
ttg gtc cgg ccc ggg ggg tcc ctg agt ctc tcc tgt gca gtc tct gga	146		
Leu Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly			
30	35	40	45
atc acc ctc agg acc tac ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc	194		
Ile Thr Leu Arg Thr Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly			
50	55	60	
aag ggg ctg gag tgg gtg gca ggt ata tcc ttt gac gga aga agt gaa	242		
Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Glu			
65	70	75	
tac tat gca gac tcc gtg cag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac agt	290		
Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser			
80	85	90	
tcc aag aac acc ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac	338		
Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp			
95	100	105	
acg gct gtg tat tac tgt gcg aga gga gca cat tat ggt ttc gat atc	386		
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala His Tyr Gly Phe Asp Ile			
110	115	120	125
tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tcg agt ggt ggt ggt ggt tcg	434		
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
130	135	140	
ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gac atc cag atg acc cag	482		
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln			
145	150	155	
tct cct tcc acc ctg tct gca tct att gga gac aga gtc acc atc acc	530		
Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr			
160	165	170	

57/74

tgc cgg gcc agc gag ggt att tat cac tgg ttg gcc tgg tat cag cag 578
 Cys Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 175 180 185
 aag cca ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc tat aag gcc tct agt tta 626
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu
 190 195 200 205
 gcc agt ggg gcc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat 674
 Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 210 215 220
 ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct gat gat ttt gca act tat 722
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr
 225 230 235
 TAC TGC CAA CAA TAT AGT AAT TAT CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC 770
 Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 240 245 250
 aag ctg gag atc aaa gac tac aag gat gac gac gat aag tgataagcgg c 820
 Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 255 260 265
 cgc 823

<210> 85

<211> 114

<212> PRT

<213> Human

<400> 85

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1

5

10

15

58/74

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser

<210> 86

<211> 342

<212> DNA

<213> Human

<400> 86

caggtgcagc tgcagcagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtga ctccatcagt agttactact ggagctggat tcggcagccc 120
 ccaggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180
 cctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagagcca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc cgcagacacg gccgtgtatt actgtgagag agggcggtac 300
 ttcgatgtct ggggccgtgg caccatggtc actgtctcct ca 342

<210> 87

59/74

<211> 57

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (57)

<223> reader sequence

<308> GenBank No. AF062252

<400> 87

atg aaa cat ctg tgg ttc ttc ctt ctc ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1

5

10

15

gtc ctg tcc

57

Val Leu Ser

<210> 88

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12E10VH1

<400> 88

atgaaacatc tgtggttctt cttctctctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60

gtgcagctgc agcagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct 110

<210> 89

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12E10VH2

<400> 89

acccaatcca ctccagtccc ttccctgggg gctgccgaat ccagctccag tagtaactac 60
tgatggagtc accagagaca gtgcaggtga gggacagggt ctccgaaggc 110

<210> 90

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12E10VH3

<400> 90

tggagtggat tgggtatatc tattacagtg ggagcaccaa ctacaacccc tccctcaaga 60
gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agagccagtt ctccctgaag 110

<210> 91

<211> 114

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12E10VH4

<400> 91

tgaggagaca gtgaccatgg tgccacggcc ccagacatcg aagtaccgcc ctctgcaca 60
gtaatacacg gccgtgtctg cggcgggtcac agagctcagc ttcagggaga actg 114

<210> 92

61/74

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12E10VHS, PCR primer

<400> 92

ttcaagcttc caccatgaaa catctgtggt tc 32

<210> 93

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12E10VHA, PCR primer

<400> 93

ttgggatcca ctcacctgag gagacagtga ccat 34

<210> 94

<211> 426

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (12)... (417)

<223> 12E10H, H chain V region

<400> 94

aagcttcac c atg aaa cat ctg tgg ttc ttc ctt ctc ctg gtg gca gct 50

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala

62/74

1	5	10	
ccc aga tgg gtc ctg tcc cag gtg cag ctg cag cag tcg ggc cca gga	98		
Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly			
15	20	25	
ctg gtg aag cct tgg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt	146		
Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly			
30	35	40	45
gac tcc atc agt agt tac tac tgg agc tgg att cgg cag ccc cca ggg	194		
Asp Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly			
50	55	60	
aag gga ctg gag tgg att ggg tat atc tat tac agt ggg agc acc aac	242		
Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn			
65	70	75	
tac aac ccc tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca gta gac aac tcc	290		
Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser			
80	85	90	
aag agc cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc gca gac aac	338		
Lys Ser Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr			
95	100	105	
gcc gtg tat tac tgt gcg aga ggg cgg tac ttc gat gtc tgg ggc cgt	386		
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg			
110	115	120	125
ggc acc atg gtc act gtc tcc tca ggtgagtgga tcccaa	426		
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser			

130

<210> 95

<211> 110

63/74

<212> PRT

<213> Mus

<400> 95

```

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
  1             5             10             15
Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
          20             25             30
Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
          35             40             45
Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
          50             55             60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
          65             70             75             80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Arg
          85             90             95
Ser Thr Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100             105             110

```

<210> 96

<211> 330

<212> DNA

<213> Mus

<400> 96

```

tcctatgtgc tgactcagcc accctcggtg tcagggtctc ctggacagtc gatcaccatc   60
tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggt ggttataact atgtctcctg gtaccaacag  120
caccagggca aagcccccaa actcatgatt tatgagggca gtaaacggcc ctcagggggtt  180

```

64/74

tctaatacgct tctctggctc caagtctggc aacaoggcct ccctgaccat ctctgggctc 240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caaccagaag cactcgggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 97

<211> 57

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (57)

<223> reader sequence

<310>

<400> 97

atg gcc tgg acc gtt ctc ctc ctc ggc ctc ctc tct cac tgc aca ggc 48

Met Ala Trp Thr Val Leu Leu Leu Gly Leu Leu Ser His Cys Thr Gly

1 5 10 15

tct gtg acc 57

Ser Val Thr

<210> 98

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12E10VL1, PCR primer

<400> 98

atggcctgga ccgttctcct cctcggcctc ctctctcaact gcacaggctc tgtgacctcc 60

tatgtgctga ctcagccacc ctcgggtgtca gggctctcctg gacagtcgat 110

<210> 99

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12E10VL2, PCR primer

<400> 99

tcatgagttt gggggctttg cctgggtgct gttggtacca ggagacatag ttataaccac 60

caacgtcact gctggttcca gtgcaggaga tggatgatcga ctgtccagga 110

<210> 100

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12E10VL3, PCR primer

<400> 100

ccccaaact catgatttat gagggcagta aacggccctc aggggtttct aatcgcttct 60

ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccatctc tgggctccag 110

<210> 101

<211> 102

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12E10VL4, PCR primer

<400> 101

taggacggtc agcttggtcc ctccgccgaa caccgagtg cttctggttg tatatgagct 60
gcagtaataa tcagcctcgt cctcagcctg gagcccagag at 102

<210> 102

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12E10VLS, PCR primer

<400> 102

atcaagcttc caccatggcc tggaccgttc t 31

<210> 103

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12E10VLA, PCR primer

<400> 103

ctaggatccg ggctgacctt ggacgggtcag cttggt 36

<210> 104

<211> 387

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

67/74

<222> (1)... (387)

<223> 12E10L, L chain V region

<310>

<400> 104

atg gcc tgg acc gtt ctc ctc ctc ggc ctc ctc tct cac tgc aca ggc 48

Met Ala Trp Thr Val Leu Leu Leu Gly Leu Leu Ser His Cys Thr Gly

1 5 10 15

tct gtg acc tcc tat gtg ctg act cag cca ccc tcg gtg tca ggg tct 96

Ser Val Thr Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser

20 25 30

cct gga cag tcg atc acc atc tcc tgc act gga acc agc agt gac gtt 144

Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val

35 40 45

ggt ggt tat aac tat gtc tcc tgg tac caa cag cac cca ggc aaa gcc 192

Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala

50 55 60

ccc aaa ctc atg att tat gag ggc agt aaa cgg ccc tca ggg gtt tct 240

Pro Lys Leu Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser

65 70 75 80

aat cgc ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc atc 288

Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile

85 90 95

tct ggg ctc cag gct gag gac gag gct gat tat tac tgc agc tca tat 336

Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr

100 105 110

Aca acc aga agc act cgg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc 384

Thr Thr Arg Ser Thr Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val

115 120 125

cta

387

Leu

<210> 105

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (24)

<223> FLAG, reader sequence

<400> 105

gac tac aag gat gac gac gat aag 24

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

<210> 106

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12E10S, PCR primer

<400> 106

tatgaattcc accatgaaac atctgtggtt 30

<210> 107

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DB2, PCR primer

<400> 107

taggagctac cgcctccacc tgaggagaca gtgaccat 38

<210> 108

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DB1, PCR primer

<400> 108

gtctcctcag gtggaggcgg tagctcctat gtgctgactc agcc 44

<210> 109

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12E10FA, PCR primer

<400> 109

attgcggccg cttatcactt atcgtcgtca tccttgtagt ctaggacggt cagcttggt 59

<210> 110

<211> 792

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (11)... (778)

<223> 12E10, Single chain Fv

<400> 110

```

gaattccacc atg aaa cat ctg tgg ttc ttc ctt ctc ctg gtg gca gct   49
      Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala
            1             5             10
ccc aga tgg gtc ctg tcc cag gtg cag ctg cag cag tcg ggc cca gga   97
Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly
      15             20             25
ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt  145
Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly
      30             35             40             45
gac tcc atc agt agt tac tac tgg agc tgg att cgg cag ccc cca ggg  193
Asp Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
            50             55             60
aag gga ctg gag tgg att ggg tat atc tat tac agt ggg agc acc aac  241
Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn
            65             70             75
tac aac ccc tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc  289
Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser
            80             85             90
aag agc cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg  337
Lys Ser Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
            95             100            105
gcc gtg tat tac tgt gcg aga ggg cgg tac ttc gat gtc tgg ggc cgt  385
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg
      110             115             120             125

```

71/74

ggc acc atg gtc act gtc tcc tca ggt gga ggc ggt agc tcc tat gtg 433
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Val

130

135

140

ctg act cag cca ccc tcg gtg tca ggg tct cct gga cag tcg atc acc 481
 Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr

145

150

155

atc tcc tgc act gga acc agc agt gac gtt ggt ggt tat aac tat gtg 529
 Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val

160

165

170

tcc tgg tac caa cag cac cca ggc aaa gcc ccc aaa ctc atg att tat 577
 Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr

175

180

185

gag ggc agt aaa cgg ccc tca ggg gtt tct aat cgc ttc tct ggc tcc 625
 Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser

190

195

200

205

aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc atc tot ggg ctc cag gct gag 673
 Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu

210

215

220

gac gag gct gat tat tac tgc agc tca tat aca acc aga agc act cgg 721
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Arg Ser Thr Arg

225

230

235

gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta gac tac aag gat gac 769
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Asp Tyr Lys Asp Asp

240

245

250

gac gat aag tgataagcgg ccgc 792
 Asp Asp Lys

255

<210> 111

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sc4.3, PCR primer

<400> 111

ggtggctgag tcagcacata ggacgatccg ccaccacccg aaccaccacc acccgaacca 60
cc 62

<210> 112

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sc1.3, PCR primer

<400> 112

gcaccatggg cactgtctcc tcaggtgggt gtgggttcggg tgggtggtggt tcgggtggtg 60
g 61

<210> 113

<211> 822

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (11)... (807)

<223> sc12E10, Single chain Fv

<400> 113

```

gaattccacc atg aaa cat ctg tgg ttc ttc ctt ctc ctg gtg gca gct 49
      Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala
            1              5              10
ccc aga tgg gtc ctg tcc cag gtg cag ctg cag cag tcg ggc cca gga 97
Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly
      15              20              25
ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt 145
Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly
      30              35              40              45
gac tcc atc agt agt tac tac tgg agc tgg att cgg cag ccc cca ggg 193
Asp Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
            50              55              60
aag gga ctg gag tgg att ggg tat atc tat tac agt ggg agc acc aac 241
Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn
            65              70              75
tac aac ccc tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc 289
Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser
            80              85              90
aag agc cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg 337
Lys Ser Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
            95              100             105
gcc gtg tat tac tgt gcg aga ggg cgg tac ttc gat gtc tgg ggc cgt 385
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg
      110              115              120              125
ggc acc atg gtc act gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt 433
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
            130              135              140

```

74/74

ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg tcc tat gtg ctg act cag cca ccc tcg 481
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser
 145 150 155
 gtg tca ggg tct cct gga cag tcg atc acc atc tcc tgc act gga acc 529
 Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr
 160 165 170
 agc agt gac gtt ggt ggt tat aac tat gtc tcc tgg tac caa cag cac 577
 Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His
 175 180 185
 cca ggc aaa gcc ccc aaa ctc atg att tat gag ggc agt aaa cgg ccc 625
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro
 190 195 200 205
 tca ggg gtt tct aat cgc ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc 673
 Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala
 210 215 220
 tcc ctg acc atc tct ggg ctc cag gct gag gac gag gct gat tat tac 721
 Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr
 225 230 235
 tgc agc tca tat aca acc aga agc act cgg gtg ttc ggc gga ggg acc 769
 Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Arg Ser Thr Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr
 240 245 250
 aag ctg acc gtc cta gac tac aag gat gac gac gat aag tgataagcgg 818
 Lys Leu Thr Val Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 255 260 265
 ccgc 822

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09259

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/09, 15/62, C07K16/28, A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/09, 15/62, C07K16/28, A61K39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Bijia DENG et al., "An Agonist Murine Monoclonal Antibody to the Human c-Mpl Receptor Stimulates Megakaryocytopoiesis", Blood, 15 September, 1998, Vol.92, No.6, pages 1981 to 1988	1-40
Y	US 5885574 A (Amgen Inc.), 23 March, 1999 (23.03.99), & JP 2000-95800 A & EP 773962 B1 & WO 96/03438 A	1-40
Y	KIPRIYANOV et al., "Bispecific CD3xCD19 Diabody for T Cell-Mediated Lysis of Malignant Human B Cells", Int. J. Cancer, (1998), Vol.77, No.5, pages 763 to 772	1-40
Y	WO 00/53634 A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 14 September, 2000 (14.09.00), & EP 1167388 A	1-40
A	Ming-Hong XIE et al., "Direct demonstration of MuSK involvement in acetylcholine receptor clustering through identification of agonist ScFv", Nature Biotechnology, August, 1997, Vol.15, No.8, pages 768 to 771	1-40

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 January, 2002 (29.01.02)Date of mailing of the international search report
05 February, 2002 (05.02.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09259

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1035132 A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 13 September, 2000 (13.09.00), & WO 99/12973 A	1-40

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ G12N15/09, 15/62, C07K16/28, A61K39/395		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ G12N15/09, 15/62, C07K16/28, A61K39/395		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
JICSTファイル(JOIS) MEDLINE(STN) WPI(DIALOG) BIOSIS(DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Bijia DENG et al., An Agonist Murine Monoclonal Antibody to the Human c-Mpl Receptor Stimulates Megakaryocytopoiesis., Blood, 15 September 1998, Vol. 92, No. 6, p. 1981-1988	1-40
Y	US 5885574 A (AMGEN INC.) 1999. 3. 23 & JP 2000-95800 A & EP 773962 B1 & WO 96/03438 A	1-40
Y	KIPRIYANOV et al., Bispecific CD3×CD19 Diabody for T Cell-Mediated Lysis of Malignant Human B Cells., Int. J. Cancer (1998), Vol. 77, No. 5, p. 763-772	1-40
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	29. 01. 02	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小暮 道明	7. 4 B 9358 印
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 00/53634 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO. LTD.) 2000. 9. 14 & EP 1167388 A	1 - 4 0
A	Ming-Hong XIE et al., Direct demonstration of MuSK involvement in acetylcholine receptor clustering through identification of agonist ScFv., NATURE BIOTECHNOLOGY, August 1997, Vol. 15, No. 8, p. 768-771	1 - 4 0
A	EP 1035132 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO. LTD.) 2000. 9. 13 & WO 99/12973 A	1 - 4 0